

FABIANA SALVATORI GUEDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA
ESPÉCIE *Rosmarinus officinalis* L.”



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, JULHO DE 2019

FABIANA SALVATORI GUEDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA
ESPÉCIE *Rosmarinus officinalis* L.”



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, JULHO DE 2019

Nome da autora: Fabiana Salvatori Guedes

Nº de aluna: 36160

Curso: Mestrado Microbiologia Clínica

Data: Julho de 2019

Título da dissertação de mestrado: Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da espécie *Rosmarinus officinalis L.*

Docente Orientadora: Professora Doutora Cristina Abreu

Docente Coorientadora: Professora Doutora Luciana Grazziotin Rossato Grandó

Atesto a originalidade do trabalho,

Assinatura da Aluna:

(Fabiana Salvatori Guedes)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica.

Sumário

As doenças transmitidas por alimentos ainda são consideradas um importante problema de saúde pública. Assim sendo, a indústria alimentícia recorre a diversas estratégias para promover a conservação e preservação dos alimentos, entre elas, o uso de aditivos alimentares, de origem natural ou sintética. O uso de antimicrobianos naturais como possíveis alternativas para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos presentes em alimentos e estender seu prazo de validade vem sendo cada vez mais estudado. Os microrganismos endofíticos, são geralmente encontrados no interior de plantas, nas partes aéreas, como folhas e caule, e são capazes de produzir substâncias antimicrobianas e outros produtos de interesse biotecnológico. A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, possui propriedades antimicrobianas, principalmente em relação ao seu potencial efeito inibidor de microrganismos patogênicos em alimentos. Assim, o presente estudo, visa isolar e identificar os fungos endofíticos do alecrim e avaliar a sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: microrganismos endofíticos, atividade antimicrobiana, doenças transmitidas por alimentos.

Abstract

Foodborne illnesses are still considered an issue of high importance in the health safety arena. Therefore, the food industry resorts to several strategies to promote the conservation and preservation of food, within them the use of additives, natural or synthetic. The utilization of natural antimicrobials as possible alternatives to inhibit the growth of pathogenic microorganisms present in food, and extend its shelf life has been studied more often in the recent years. The endophytic microorganisms, are generally found in plants, on the aerial portions such as leaves and stems, and are capable of producing antimicrobial substances along with other products of biotechnologic interest. The species *Rosmarinus officinalis L.*, known as Rosemary, has antimicrobial properties, specially in regards to inhibiting pathogenic microorganisms found in foods. Thus, this study seeks to isolate and identify the endophytic fungi of the rosemary and evaluate its antimicrobial properties.

Key Words: endophytic microorganisms, antimicrobial properties, food-borne illness

Agradecimentos

Construir uma dissertação de mestrado não só exige organização, dedicação e muito estudo, mas também contar com um grupo de pessoas capacitadas e disponíveis que se dediquem e acreditem na causa da pesquisa científica. Ainda, exige abrir mão de muitas vezes estar com a família e amigos, bem como, em se reestruturar em relação as atividades do cotidiano, como por exemplo o trabalho e demais responsabilidades do dia a dia, para que o projeto pudesse ser realizado e sonho se concretizar. Assim, meus sinceros agradecimentos, aos envolvidos nessa jornada:

Em especial ao meus pais, por acreditarem nos meus sonhos, e me incentivarem sempre. Por muitas vezes abrir mão de seus próprios sonhos e projetos, para que eu pudesse realizar os meus. Sem o apoio de vocês, nada teria sido possível.

À minha colega e amiga, Tatiane Basso, por todo o incentivo e companheirismo. Por ter tido papel fundamental para que eu não desistisse desse desafio. Por sem dúvida ter sido um porto seguro nessa jornada, me tranquilizando e dando forças para seguir com esse sonho, e me mostrando com otimismo que tudo seria possível.

À minha orientadora, Doutora Cristina Abreu, pelas valiosas contribuições, para melhorar a qualidade do trabalho e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À minha coorientadora, Doutora Luciana Grazziotin Rossato Grando, pela confiança em disponibilizar os laboratórios da Universidade de Passo Fundo, para que a realização prática do trabalho pudesse acontecer e além disso, pela disponibilidade e parceria em realizar este trabalho. Minha eterna gratidão.

À Doutora Charise Bertol, professora responsável pelo Laboratório de Qualidade Biológica, a qual, sem obrigação nenhuma, me acolheu e instruiu em toda a parte prática do trabalho, auxiliando com todo seu conhecimento, para que o trabalho pudesse

ser realizado. Além, de estar disponível sempre, esclarecendo dúvidas, orientando e ajudando ao longo de toda a pesquisa. Minha eterna gratidão.

À professora Doutora Fabiana Tonial da Universidade de Passo Fundo, pela disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos e valiosas contribuições durante a parte prática desse trabalho, bem como, pelo auxílio na parte de identificação macroscópica e microscópica do trabalho. Meus sinceros e eternos agradecimentos.

Às alunas Silvia Cristina Fagundes e Micheila Alana Fagundes, e a funcionária Nadia, do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, pelo auxílio e parceria durante a realização prática do trabalho.

À todos os professores do Mestrado de Microbiologia Clínica da Universidade Fernando Pessoa, por contribuírem com todo seu conhecimento e empatia durante essa formação.

Sem cada pessoa citada acima, nada disso seria possível. Vocês fizeram a diferença durante essa jornada. Obrigada pela contribuição de cada um.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	14
II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	16
1. Doenças transmitidas por alimentos	16
i. Principais microrganismos causadores de DTAs	18
ii. Conservação de alimentos	26
2. Fungos	27
i. Fungos endofíticos	32
3. Rosmarinus officinalis L.	35
i. Rosmarinus officinalis L. e conservação de alimentos	37
ii. Rosmarinus officinalis L. e atividade antimicrobiana	37
III. ENQUADRAMENTO METODOLÓGICO	40
1. Objetivos do estudo	40
i. Objetivo Geral	40
ii. Objetivos Específicos	40
2. Tipo de estudo	40
3. Colheita do material vegetal	40
4. Isolamento de fungos endófitos	41
5. Identificação de fungos endófitos	43
6. Inoculação dos fungos endófitos em Ágar Batata Dextrose (PDA)	44
7. Atividade antimicrobiana dos fungos endófitos	45
IV. RESULTADOS	48
1. Caracterização da amostra	48
2. Identificação Macroscópica	48
3. Identificação Microscópica	48
4. Atividade Antimicrobiana dos fungos endófitos	49
V. DISCUSSÃO	53
VI. CONCLUSÃO	59
VII. BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Identificação microscópica de fungos endófitos isolados do alecrim (A = amostra de alecrim colhida numa quinta).....	49
Tabela 2: Identificação microscópica de fungos endófitos isolados do alecrim (B = amostra de alecrim colhida numa horta residencial).....	49
Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de fungos endófitos isolados do alecrim (A = amostra de alecrim colhida numa quinta), para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	50
Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de fungos endófitos isolados do alecrim (B = amostra de alecrim coletada numa horta residencial), para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	52

ÍNDICE DE IMAGENS

Imagem 1: Alecrim.....	36
Imagem 2: Amostra de alecrim parafinado e fragmentado.....	41
Imagem 3: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 3 dias de incubação.....	41
Imagem 4: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 3 dias de incubação.....	42
Imagem 5: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 5 dias de incubação.....	42
Imagem 6: Amostras de alecrim (horta residencial) com 3 dias de incubação.....	42
Imagem 7: Amostras de alecrim (horta residencial) com 3 dias de incubação.....	42
Imagem 8: Amostras de alecrim (horta residencial) com 5 dias de incubação.....	43
Imagem 9: Kit estéril para cultivo.....	44
Imagem 10: Fungo com 1 dia de incubação.....	44
Imagem 11: Fungo com 3 dias de incubação.....	44
Imagem 12: 48 horas de incubação.....	45
Imagem 13: 72 horas de incubação.....	45
Imagem 14: 96 horas de incubação.....	45
Imagem 15: 120 horas de incubação.....	45
Imagem 16: Fungo - 2º dia incubação.....	45
Imagem 17: Fungo - 3º dia incubação.....	45
Imagem 18: Resultado do confronto entre fungos endófitos e microrganismos patogénios de uma das amostras testadas.....	47
Imagem 19: A1-2.....	51
Imagem 20: A4-3.....	51
Imagem 21: A5-2.....	51
Imagem 22: A7-2.....	51
Imagem 23: B6-2.....	51
Imagem 24: B8-3.....	51
Imagem 25: Fungo endofítico A1.....	73
Imagem 26: Fungo endofítico A2.....	74
Imagem 27: Fungo endofítico A3.....	75
Imagem 28: Fungo endofítico A4.....	76
Imagem 29: Fungo endofítico A5.....	77

Imagem 30: Fungo endofítico A6.....	78
Imagem 31: Fungo endofítico A7.....	79
Imagem 32: Fungo endofítico A8.....	80
Imagem 33: Fungo endofítico B1.....	81
Imagem 34: Fungo endofítico B2.....	82
Imagem 35: Fungo endofítico B3.....	83
Imagem 36: Fungo endofítico B4.....	84
Imagem 37: Fungo endofítico B5.....	85
Imagem 38: Fungo endofítico B6.....	86
Imagem 39: Fungo endofítico B7.....	87
Imagem 40: Fungo endofítico B8.....	88
Imagem 41: Fungo endofítico B9.....	89
Imagem 42: A1 – <i>Aspergillus</i>	90
Imagem 43: A2 – <i>Alternaria</i>	90
Imagem 44: A4 – <i>Penicillium</i>	90
Imagem 45: A6 – <i>Absidia</i>	90
Imagem 46: B2 – <i>Acremonium</i>	91
Imagem 47: B4 – <i>Acremonium</i>	91
Imagem 48: B7 – <i>Acremonium</i>	91
Imagem 49: B9 – <i>Chaetomium</i>	91
Imagem 50: A3 – Micélio estéril.....	92
Imagem 51: A5 – Micélio estéril.....	92
Imagem 52: A7 – Micélio estéril.....	92
Imagem 53: A8 – Micélio estéril.....	92
Imagem 54: B1 – Micélio estéril.....	93
Imagem 55: B3 – Micélio estéril.....	93
Imagem 56: B5 – Micélio estéril.....	93
Imagem 57: B6 – Micélio estéril.....	93
Imagem 58: B8 – Estrutura não identificada.....	94

ABREVIATURAS

Ao longo da presente dissertação de mestrado irão emergir algumas abreviaturas, nomeadamente:

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

DAEC - *E. coli* difusamente adesiva

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTAs - Doenças transmitidas por alimentos

EAEC - *E. coli* enteroagrativa

EAPs - Extratos hidroalcolócos padrão

EHEC - *E. coli* enterro-hemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

EOs - Óleos essenciais

EPEC - *E. coli* enteropatogénica

ETEC - *E. coli* enterotoxigénica

EU - União Europeia

MH - Ágar Mueller-Hinton

MIC - Concentração inibitória mínima

LPS - Lipopolissacarídeo

PDA - Ágar batata dextrose

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA - Ácido ribonucleico

RS - Rio Grande do Sul (estado)

RSPF - Herbário Rio Grande do Sul

SEs - Enterotoxinas estafilocócicas

UPF - Universidade de Passo Fundo

WHO - *World Health Organization*

(+ **A**) - Atividade alta

(+ **B**) - Atividade baixa

(-) - Sem atividade

I. INTRODUÇÃO

A presente dissertação intitulada “Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da espécie *Rosmarinus officinalis L.*” é a realização de um projeto de investigação conducente a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica pela Universidade Fernando Pessoa, a qual pretendeu isolar e identificar os fungos endofíticos do alecrim e avaliar sua atividade antimicrobiana.

As doenças transmitidas por alimentos ainda são frequentes e continuam sendo consideradas um problema de saúde pública. A motivação científica para desenvolver este trabalho partiu da formação académica como nutricionista, com experiência em nutrição clínica, onde a aluna, em seu exercício profissional, orienta os utentes na importância de uma alimentação saudável, não somente sob aspecto nutricional, mas também, na qualidade microbiológica dos alimentos. A alimentação adequada, dentro dos aspectos citados, é capaz de promover a saúde da população e evitar doenças transmitidas por alimentos, as quais podem trazer consequências importantes à saúde pública. Como nutricionista, a investigadora acredita que dentro das estratégias utilizadas pela indústria de alimentos para evitar a deterioração dos mesmos, deve-se considerar o emprego de conservantes naturais, como alternativas em substituição ao uso de aditivos sintéticos, os quais, podem causar efeitos indesejáveis como, carcinogenicidade, toxicidade e teratogenicidade.

O uso de antimicrobianos naturais como possíveis alternativas para inibir o crescimento de microrganismos patogénicos presentes em alimentos e estender seu prazo de validade vem sendo cada vez mais estudado. Os microrganismos endofíticos, encontrados no interior de plantas, geralmente na parte aérea, como folhas e caule, podem ser capazes de produzir toxinas, fatores de crescimento e substâncias antimicrobianas, podendo, dessa forma, ser uma alternativa, para novas formas de conservação de alimentos de maneira mais natural. Assim, sendo, procurou-se através deste estudo, isolar e identificar os fungos endofíticos presentes na espécie *Rosmarinus officinalis L.*, conhecida popularmente como alecrim, bem como, avaliar a sua atividade antimicrobiana, para que, o uso de metabólitos de microrganismos endofíticos com

potencial antimicrobiano, de forma promissora, possa ser considerado como alternativa para conservação de alimentos, pela indústria alimentícia.

Esta foi uma pesquisa de caráter qualitativo. No que concerne a estruturação desta dissertação de mestrado, a mesma encontra-se dividida em 7 capítulos. No primeiro capítulo, onde se insere a introdução, é abordada a investigação, justificando a razão e pertinência da presente investigação, bem como, a descrição dos objetivos da mesma. O segundo capítulo compreende na revisão teórica, abordando temáticas referentes a doenças transmitidas por alimentos como problema de saúde pública, conservação de alimentos pela indústria alimentícia, fungos endofíticos e suas propriedades antimicrobianas, potencial antimicrobiano da espécie *Rosmarinus officinalis L.* e sua aplicação na conservação de alimentos. No terceiro capítulo, descreve-se o enquadramento metodológico, ou seja, o desenho da investigação, nomeadamente, o tipo de estudo, colheita da amostra vegetal, procedimentos, análise dos dados e variáveis. No quarto capítulo, encontram-se os resultados obtidos com a presente investigação, no que respeita o isolamento, identificação e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolado da espécie *Rosmarinus officinalis L.*. No quinto capítulo expõe-se a discussão acerca dos resultados encontrados, tendo em conta os objetivos da presente investigação. No sexto capítulo, apresenta-se a conclusão da investigação, ressaltando as limitações, possibilidades de estudos futuros e relevância desta investigação na atualidade. O sétimo capítulo, enumeram-se as referências bibliográficas e como forma de encerrar esta dissertação de mestrado.

Como limitação do presente estudo, podemos citar a contaminação de algumas amostras na etapa de triagem da atividade antimicrobiana, já realizadas em triplicata, para não comprometer sua totalidade em relação aos resultados da pesquisa. Outra limitação, presente foi que em algumas amostras (A5 e B8) na etapa de triagem da atividade antimicrobiana não houve crescimento das estrias para o microrganismo testado *Salmonella typhimurium*.

Os resultados mais promissores, do presente estudo, em relação a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados do alecrim, foram principalmente relativamente à alta atividade antimicrobiana apresentada para *Staphylococcus aureus*. Ainda, obteve-se baixa atividade para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. Doenças transmitidas por alimentos

Nas últimas décadas, a alimentação tem sido motivo de preocupação em todos os países. Com a globalização, ficaram mais evidentes os problemas relacionados à qualidade dos alimentos para consumo humano. Assim, a World Health Organization (WHO) tem alertado para a necessidade de se coibir a contaminação de alimentos por agentes biológicos com potencial de causar danos à saúde (WHO, 2015).

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são aquelas causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTAs no mundo, sendo que a maioria delas são infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e outros parasitas. Considera-se surto de DTAs quando duas ou mais pessoas apresentam doenças ou sintomas semelhantes após ingerirem alimentos ou água da mesma origem, normalmente em um mesmo local (Brasil, 2017).

Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais, se destacam o crescente aumento das populações, a existências de grupos populacionais vulneráveis e mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Ainda, contribui, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados à população, a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (fast-foods), o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudança de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive em nível internacional (Brasil, 2010).

Considerando apenas os agentes biológicos patogênicos para o homem, bactérias, vírus, protozoários, parasitas e toxinas naturais, vê-se que um grande número é transmitido

pela água e alimentos, provocando quadros de gastroenterites agudas. Há grande diversidade destes agentes. Só a bactéria *Salmonella spp.* tem mais de 2.400 sorotipos patogênicos para o homem (Satcher, 2000).

Assim sendo, a multiplicidade de agentes causais e as suas associações a alguns dos fatores citados, resultam em um número significativo de possibilidades para a ocorrência das DTAs, infecções ou intoxicações, as quais, podem apresentar-se de forma crônica ou aguda, com características de surto ou de casos isolados, com distribuição localizada ou disseminada e com formas clínicas diversas (Brasil, 2010).

As DTAs são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Em muitos países, durante as últimas duas décadas, têm emergido com um crescente problema econômico e de saúde pública (Brasil, 2010). A ação dos agentes patogênicos depende da precariedade das condições de higiene do meio e da susceptibilidade do hospedeiro humano, tendo implicações graves para a saúde humana. Estima-se que anualmente causem patologias numa em cada 10 pessoas e 33 milhões de anos de vidas são perdidas. Por ano, ocorrem 1,5 bilhão de episódios de gastroenterites agudas em todo o mundo, além disso, as DTAs podem ser fatais, em especial, em crianças menores de 5 anos, causando 420 mil mortes. O Center for Disease Control and Prevention (CDC), centro de vigilância de doenças dos Estados Unidos, estima que anualmente cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas), ficam doentes, 128 mil são hospitalizados e 3.000 morrem de doenças transmitidas por alimentos (Brasil, 2017; Satcher, 2000).

O CDC estima que 31 principais patógenos causam 9,4 milhões de episódios de doenças transmitidas por alimentos a cada ano, levando a quase 56.000 internações e 1.351 mortes. As salmonelas não tifoïdes são a segunda causa principal dessas doenças, após o norovírus, e a causa da maioria (35%) das hospitalizações (Sacallan *et al.*, 2011).

No Brasil, a maioria das DTAs são causadas por bactérias (principalmente por *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus*). No entanto, também ocorrem surtos causados por vírus (rotavírus e norovírus) e, em menor proporção por substâncias

químicas. Assim sendo, os principais agentes etiológicos das doenças transmitidas por alimentos são: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, coliformes, *Bacillus cereus*, rotavírus e norovírus. O período de incubação varia conforme o agente etiológico, mas usualmente é curto, variando de 1 a 2 dias a no máximo 7 dias, sendo os agentes etiológicos mais frequentes são os de origem bacteriana, como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Brasil, 2017).

A prevenção de DTAs levou à construção de sofisticados sistemas de segurança alimentar e controlo de alimentos, principalmente em países desenvolvidos, mas as doenças transmitidas por alimentos ainda são um importante problema de saúde pública, trazendo consequências importantes à saúde dos indivíduos, fato este, reconhecido pela WHO (WHO, 2002; 2015).

i. Principais microrganismos causadores de DTAs

a) *Salmonella*

O género *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e consiste de bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, variando em diâmetro de cerca de 0,7 a 1,5 µm e comprimento de 2 a 5 µm. Esses microrganismos são anaeróbios facultativos, geralmente móveis por flagelos peritríqueos. Em relação ao metabolismo, as salmonelas são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, não produzem oxidase, indol, acetoína e produzem catalase, sulfeto de hidrogénio (H₂S), não hidrolisam ureia, mas descarboxilam lisina e ornitina (de Santos e Monte, 2012; Campos, 2015).

O género *Salmonella* contém cerca de 2.324 tipos diferentes, as quais são denominadas ainda como sorovares ou sorotipos. São diferenciáveis pelos seus antígenos O, H e Vi. Esses sorotipos são divididos em sorogrupos de acordo com os fatores antigénicos comuns. A salmonela possui uma estrutura complexa de lipopolissacarídeos (LPS), a qual origina o antígeno O. O número de repetição de unidades e a composição de polissacarídeo variam consideravelmente no LPS da *Salmonella* sendo de vital

importância no que se refere aos estudos epidemiológicos. Os polissacarídeos são antigénios e portanto, podem ser utilizados imunologicamente para identificar salmonelas isoladas. É o sorotipo da salmonela isolada que auxilia os estudos epidemiológicos, traçando o vetor das infecções causadas (Brasil, 2011).

As salmonelas infectam o homem e praticamente todos os animais domésticos e selvagens, incluindo pássaros, répteis e insetos. Estas bactérias quando estão presentes em ambientes, água potável e alimentos deve-se a contaminação por fezes de indivíduos doentes ou portadores. No homem as salmonelas causam vários tipos de infecção, sendo mais comuns a gastroenterite e a febre tifoide (Campos, 2015).

A salmonelose humana é a segunda doença de origem alimentar na União Europeia (EU) e na maioria dos países europeus, apenas ultrapassada pela campilobacterose. A taxa de notificação da EU em 2010 foi de 21.5 casos por 100.000 habitantes, variando de 1.9 em Portugal a 91.1 casos confirmados por 100.000 habitantes na Eslováquia (EFSA, 2012).

No Brasil, em 2017, 598 surtos de DTAs foram notificados, com 9.426 doentes, 1.439 hospitalizados e 12 óbitos relacionados. Dentre os agentes etiológicos identificados como responsáveis pelos surtos confirmados laboratorialmente (89 surtos), a *Escherichia coli* (46,1%/41 surtos) foi o mais comum, seguida pela *Salmonella spp.* (14,6%/13 surtos) (Brasil, 2017).

Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem necessidade de hospitalização e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, a ocorrência das salmoneloses na população humana transmitida por alimentos é provavelmente subestimada. É importante salientar que a subnotificação dos surtos de origem alimentar pelos serviços de vigilância epidemiológica é uma realidade mundial (Shinohara *et al.*, 2008).

Uma ampla variedade de alimentos podem ser contaminados com a *Salmonella spp.*, pois aqueles que possuem alto teor de umidade, de proteína e de hidratos de carbono, como carne bovina, suínos, aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas recheadas, são mais susceptíveis à deterioração, sendo comumente identificados como veículos em surtos de infecções por *Salmonella*. Os ovos podem ser contaminados a partir de rachaduras na casca ou através de infecção transovariana, ou seja, a partir de um ovário ou oviduto infectado, para a gema, antes da deposição da casca. Além disso a estocagem prolongada dos ovos a temperaturas variáveis de 18°C a 30°C favorece a multiplicação da bactéria no seu interior. Outros grupos de alimentos como frutas e vegetais minimamente processados também podem ser veiculadores de salmoneloses (Suresh, *et al.*, 2006; Basti, *et al.*, 2006; Vo *et al.*, 2006, CDC, 2009; Newell *et al.*, 2010 e Campos 2015).

A transmissão para o homem geralmente ocorre pelo consumo de alimentos ou água contaminada, embora a transmissão pessoa a pessoa possa ocorrer particularmente nos hospitais (Pinto *et al.*, 2004; Campos, 2015).

A grande maioria dos sorotipos de salmonelas são patogênicos para o homem, de forma que os sintomas clínicos podem ser divididos em três grupos. A febre tifoide, causada por *Salmonella typhi*, só acomete o homem e não possui reservatórios em animais. Normalmente a forma de disseminação da infecção é interpessoal e através da água ou alimentos contaminados. Os sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. A febre tifoide pode evoluir para morte, caracterizada por septicemia, febre contínua, cefaleia e diarreia. O período de incubação usualmente varia de 7 a 21 dias e a duração da doença pode chegar a 8 semanas (Shinohara, *et al.*, 2008).

Na febre entérica, o agente etiológico é a *Salmonella paratyphi* A, B, C, os sintomas clínicos são mais brandos que em relação à febre tifoide, podendo evoluir para septicemia, mas frequentemente desenvolve um quadro de gastroenterite, febre e vômitos. Essa doença pode ser causada pelo consumo de água e alimentos, especialmente leite e vegetais crus, mariscos e ovos. O período de incubação é

usualmente de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de 3 semanas (Shinohara *et al.*, 2008; Campos, 2015).

Deve-se ressaltar que a maioria dos sorotipos da salmonela são patogênicos ao homem apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo da patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (Germano e Germano, 2003).

Já as infecções entéricas decorrentes de outras *Salmonellas*, ou também chamadas de salmoneloses, desenvolvem quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. Os alimentos mais incriminados contaminados são carne bovina, aves, suínos e ovo crus. Os sintomas surgem de 12 a 36 horas, podendo durar os sintomas até 72 horas. O episódio sofre resolução geralmente em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos (Shinohara *et al.*, 2008).

Um aspecto de extrema importância tem sido o aumento expressivo da ocorrência de amostras com bactérias multirresistentes aos antimicrobianos. Nos países desenvolvidos esta ocorrência tem sido particularmente associada ao emprego de doses terapêuticas e subterapêuticas de antibióticos nos animais, ou para a promoção do crescimento (aditivo de rações), enquanto nos países em desenvolvimento, o aumento da resistência tem sido relacionado ao uso de antimicrobianos na medicina humana, tanto nos hospitais, como na comunidade (Campos, 2015).

b) *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria importante a qual faz parte das enterobactérias. É uma bactéria Gram-negativa, não gera esporos, pode ser cultivada facilmente a 37°C. O intestino humano normal contém *Escherichia coli*. A bactéria *Escherichia coli* pode ser excretada com as fezes e provocar doenças. Embora esteja fora do intestino, a *Escherichia coli* pode viver na água. Uma vez que a *Escherichia coli* é detectável no

intestino, se detectada na água ou alimentos, significa que a água ou alimentos estão contaminados com fezes (Wiwanitkit, 2011).

Atualmente, a classificação de diferentes estirpes de *Escherichia coli* é baseada no sistema de classificação sorológica por diferentes antígenos que são únicos para cada espécie, sendo a classificação baseada nos principais antígenos: antígeno O, antígeno H e antígeno K (Wiwanitkit, 2011).

As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos de patogenicidade em seis grupos:

1. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

É um dos principais agentes de doenças diarreicas em países em desenvolvimento. Comumente conhecida como causadora da diarreia dos viajantes e diarreia em grupo de bebês nos países em desenvolvimento. Foi definida por sua capacidade em produzir as enterotoxinas termolábil e termoestável. O mecanismo de patogenicidade das ETEC compreende basicamente a colonização da mucosa intestinal e a produção de enterotoxinas. Estimativas globais indicam que amostras de ETEC são responsáveis por causar 400.000 mortes anuais, especialmente em crianças com menos de 5 anos de idade, que vivem em regiões de baixas condições socioeconômicas e deficientes de saneamento. As infecções são transmitidas principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados. Pode levar a uma diarreia branda até uma diarreia mais grave, acompanhada de desidratação, podendo em casos extremos, levar ao choque. No entanto, a infecção é autolimitada, tendo duração média de 1 a 2 dias (Brasil, 2011; Guth, 2015).

2. *E. coli* enteropatogênica (EPEC):

A EPEC causa diarreia aquosa em crianças. Também causa vômitos, febre, diarreia secretora abundante contendo muco, mas desprovida de sangue, havendo importante

perda de fluidos e eletrólitos nas fezes, bem com febre baixa e vômitos. O microrganismo coloniza as microvilosidades de todo o intestino para produzir a lesão característica de ligação ou desaparecimento nas bordas da microvilosidade (Brasil, 2011). A dose infectante de EPEC, necessária para causar diarreia, bem com o período de incubação para o desenvolvimento da diarreia, não foram estabelecidos (Gomes e Hernandez, 2015).

3. *E. coli* enterro-hemorrágica (EHEC):

A EHEC causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urémica hemolítica e púrpura trombótica trombocitopénica. Esse grupo inclui a *E.coli* verotocigénica (VTEC, também conhecida como *E. coli* produtora de shigatoxina ou STEC) e os sorotipos O157, 26 e 111 (Brasil, 2011).

4. *E. coli* enteroagrativa (EAEC):

A EAEC alinha-se paralelamente em fileiras, tanto nos tecidos celulares, quanto em lâminas. Produzem uma toxina termosensível, relacionada antígenicamente à hemolisina, mas que não é hemolítica e uma toxina termoestável codificada por um plasmídeo (EAST1), sem qualquer relação com a enterotoxina termoestável da ETEC. Adultos e crianças são susceptíveis a infecções intestinais causadas por EAEC, e a doença típica é manifestada por diarreia secretora, mucoide e aquosa, com período de incubação curto, pouca febre e eventualmente, vômito (Brasil, 2011; Elias Junior e Gomes, 2015).

5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

O microrganismo coloniza o cólon e contém um plasmídeo de 120 a 140 mD necessário pela invasividade, o qual carrega todos os genes necessários para a virulência, onde a capacidade de invasão e sobrevivência da EIEC depende de genes contidos no plasmídeo pInv bem como de genes cromossômicos. As infecções intestinais provocadas

pela EIEC são mais frequentes em crianças com mais de dois anos de idade e no adulto. O reservatório é o próprio homem e a transmissão é fecal-oral, adquirindo-se a doença pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Causa febre e diarreias profusas contendo muco e sangue (Brasil, 2011; Martinez, 2015).

6. *E coli* difusamente adesiva (DAEC)

A DAEC de forma não consistente, tem sido associada em alguns estudos com diarreia. Esta estirpe caracteriza-se por células com formato de bastonetes retos, os quais medem de 1,1 a 1,5 por 2 a 6 micrometros, são móveis pela presença de flagelos peritríqueos ou imóveis, não esporulados, Gram negativo e anaeróbios facultativos. É considerada um habitante normal do intestino humano e de outros animais, podendo causar infecções somente em determinadas situações. Praticamente todos os alimentos, seja de origem animal ou vegetal, que não tenham sido objeto de processamento, desde que, em algum momento tenham sido sujeitos a poluição fecal, podem veicular *E. coli*. Onde os principais sintomas são diarreias, febre e náuseas, os quais aparecem geralmente dentro de 6 a 36 horas após a ingesta do alimento contaminado (Brasil, 2011).

c) *Staphylococcus aureus*

São cocos Gram-positivos que apresentam resistência a uma ampla gama de condições ambientais, podendo sobreviver em ambientes secos, com pH mínimo de 4.2, máximo de 9.3, com ótimo de 7,0-7,5 e, a temperatura mínima de 6°C e máxima de 48°C, com ótimo de 37°C. Ainda toleram altas concentrações de cloreto de sódio de até 25%, com ótimo de 7-10%. São anaeróbios facultativos, não fastidiosos, não móveis, e quando cultivados em meio sólido tendem a se agrupar em cachos que pode ser evidenciado por microscopia óptica através de uma coloração de Gram (McCulloch e Mamizuca, 2015).

O *Staphylococcus aureus* produz uma grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência, como, estafiloquinases, hialurodinases, fosfatases, coagulases e hemolisinas.

As intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas, proteínas de baixo peso molecular (26.000 a 34.000 Da) (Brasil, 2011).

Os estafilococos existem no ar, no solo, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou equipamentos de processamento de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios (da Cunha, 2017). Estão presentes nas vias nasais e na garganta, no cabelo e na pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis. Apesar dos manipuladores de alimentos serem, normalmente, as principais fontes de contaminação dos alimentos, quando há surtos, os equipamentos e as superfícies também podem ser a fonte de contaminação (Brasil, 2011).

A ingestão de toxinas superantigênicas de *Staphylococcus aureus* pré-formadas em alimento em decorrência do crescimento bacteriano nos alimentos resulta no desencadeamento de uma síndrome chamada de toxinfecção alimentar estafilocócica. Essas toxinas são denominadas de enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Assim, a manipulação de alimentos por indivíduos portadores de *Staphylococcus aureus* produtor de SEs e o subsequente armazenamento desse alimento em temperatura que não impeça o crescimento do *S. aureus* por tempo suficiente a ponto de a população bacteriana atingir fase estacionária de crescimento é a principal causa epidemiológica de toxinfecção alimentar estafilocócica (McCulloch e Mamizuca, 2015).

Os alimentos normalmente relacionados às toxinfecções causadas por *Staphylococcus aureus* são saladas como as de atum, galinha, batata e massa, produtos de panificação como creme, tortas de creme e bombas de chocolate, sanduíches e leite ou produtos lácteos. Os alimentos requerem manipulação considerável durante o processamento e que são mantidos a temperaturas ligeiramente elevadas após o mesmo são aqueles frequentemente envolvidos em intoxicações alimentares causadas por estafilococos. Por não competir com outras bactérias, raramente causa doenças alimentares após a ingestão de produtos crus. É inativado rapidamente pelo calor, mas é resistente a secagem e tolerante a altas concentrações de sais (Brasil, 2011).

Os sintomas de toxinfecção alimentar iniciam rapidamente após a ingestão de toxina pré-formada e são caracterizados por náuseas e vômitos, com ou sem o acompanhamento de diarreia. Por não ocorrer produção das SEs, no corpo de hospedeiro, a toxinfecção alimentar é autolimitante, já que a concentração de SEs, diminui com os vômitos e diarreia, o que configuram a síndrome como relativamente benigno (McCulloch e Mamizuca, 2015).

O *Staphylococcus aureus* conseguiu adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos já desenvolvidos, e essa característica de ter populações estáveis resistentes aos antibióticos com alta prevalência no meio ambiente é um sério motivo de preocupação, já que compromete a eficácia da utilização de antibióticos contra infecções estafilocócicas a um longo prazo (McCulloch e Mamizuca, 2015; da Cunha, 2017).

ii. Conservação de alimentos

A conservação de alimentos é a ciência de prolongar a vida de prateleira de um alimento, impedindo o crescimento de microrganismos e/ou regulando os processos químicos como a oxidação para manter a qualidade nutricional original sem comprometer as características organolépticas dos alimentos (Rajeev, 2017).

A pesquisa em segurança dos alimentos deve envolver métodos mais sensíveis, rápidos e automatizados para detectar e caracterizar com precisão os patógenos em produtos alimentícios. As empresas de alimentos devem aderir estritamente aos regulamentos e diretrizes de segurança de alimentos implementados pelas agências reguladoras. Os programas de treinamento em segurança alimentar devem ser obrigatórios para o pessoal que trabalha na empresa de alimentos. Oficinas de segurança alimentar podem ser realizadas através de serviços de extensão e universidades para promover educação do público, também podem ser consideradas estratégias para evitar a incidência de patógenos veiculados por alimentos em produtos alimentícios (Santos e Monte, 2012).

Muitas estratégias para a preservação dos alimentos são aplicadas pela indústria alimentícia para evitar a sua deterioração, incluindo o emprego de conservantes naturais ou sintéticos, sendo estes aditivos alimentares (Hyldgaard, Myging e Meyer, 2012; Gillois *et al.*, 2018).

O controlo químico aplicado para evitar a deterioração de alimentos e o crescimento de bactérias patogénicas, levou os investigadores a examinar alternativas naturais em substituição ao uso de aditivos sintéticos, devido a efeitos indesejáveis, como, carcinogenicidade, toxicidade, teratogenicidade e períodos lentos de degradação, que também poderiam levar a problemas ambientais, como a poluição (Faleiro, 2011; Mariutti *et al.*, 2011; Nieto, 2017).

Atualmente é crescente o interesse em antimicrobianos naturais como alternativas potenciais aos antimicrobianos convencionais para prolongar a vida útil dos alimentos e combater os agentes patogénicos transmitidos por aqueles (Burt, 2004; Calo *et al.*, 2015; Mahian e Sani, 2016; Fernández-Lópes e Viuda-Martos, 2018; Pellegrini *et al.*, 2018).

2. Fungos

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo, água, em alimentos, em detritos em geral, em animais e no homem, e em sua maioria são aeróbios estritos, com exceção de certas leveduras fermentadoras anaeróbias facultativas, que podem desenvolver-se em ambiente com oxigénio reduzido ou mesmo na ausência deste (ANVISA, 2004; Gompertz, *et al.*, 2015 e Manoharachary *et al.*, 2016). Aproximadamente 100.000 espécies de fungos já foram descritas, e a maioria habita principalmente o solo ou matéria vegetal morta (Madigan *et al.*, 2016).

A estrutura e os componentes das células fúngicas diferem grandemente em diferentes estágios de crescimento, em diferentes partes, e também são influenciados por fatores nutricionais e ambientais (Madigan *et al.*, 2016).

Podem ser unicelulares ou multicelulares, embora a maioria seja multicelular. Estes últimos são formados por uma rede de filamentos denominados de hifas, a partir das quais os esporos assexuados são produzidos. As hifas têm paredes celulares tubulares que envolvem a membrana citoplasmática, frequentemente são septadas, com paredes transversais dividindo cada hifa em células separadas. No entanto, em alguns casos, a célula vegetativa de uma hifa pode conter mais de um núcleo, onde frequentemente estão presentes centenas de núcleos devido à divisão repetida sem a formação de paredes transversais – estrutura cenocítica. Cada filamento de hifa cresce principalmente a partir da extremidade, por meio da extensão da célula terminal. As hifas normalmente crescem em conjunto, ao longo de uma superfície, formando tubos compactos macroscopicamente visíveis, sendo estes, denominados micélio. A partir do micélio, hifas aéreas crescem acima da superfície e esporos, denominados conídios, são formados nas suas extremidades, sendo assexuados, e podendo ter pigmentação negra, verde, vermelha, amarela ou marrom (Madigan *et al.*, 2016).

Todas as células fúngicas são eucarióticas, ou seja, possuem núcleo com membrana nuclear. A maioria dos fungos possui parede celular constituída de quitina, um polímero de *N*-acetilglicosamina. A parede celular é responsável pela rigidez da célula fúngica, sendo composta basicamente por polissacarídeos de natureza celulósica ou quitínica, as quais, dependem do grupo de fungos ou a mistura das duas substâncias, além de proteínas e lipídios, no entanto, apresentam variações dependendo da espécie de fungo, da idade, composição do substrato de crescimento, pH e temperatura, substâncias essas, que irão configurar rigidez à parede celular. Os glucanos e os mananos estão combinados com proteínas, formando as glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas (Gompertz, *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2016 e Manoharachary, *et al.*, 2016).

A membrana plasmática contém citoplasma tendo as mesmas funções da membrana encontradas em outras células, sendo composta de dupla camada de fosfolipídios, associada a proteínas e esteróis (ergosterol), além de apresentar uma série de invaginações, que dão origem a um sistema de vacúolos ou vesículas, responsáveis por

um contato entre o meio externo e o interior da célula. Os vacúolos são de vários tamanhos, podendo ter função digestiva ou de reserva, armazenando glicogênio. As proteínas servem como enzimas, que fornecem a membrana diferentes propriedades funcionais, enquanto os lipídios dão à membrana sua verdadeira propriedade estrutural (Gompertz, *et al.*, 2015; Esposito e de Azevedo, 2010).

A síntese e o metabolismo energético e plasmático, ocorre no citoplasma, onde são encontrados: inclusões de glicogênio (principal substância de reserva de energia dos fungos), vacúolos de alimento e gorduras, mitocôndrias (responsáveis pelos mecanismos energéticos, constituem o sítio da fosforilação oxidativa e contém DNA e ribossomos próprios), ribossomos e retículo endoplasmático (responsável pela síntese de proteínas) (Gompertz, *et al.*, 2015).

Os fungos podem ter um, dois ou mais núcleos, envoltos por uma membrana nuclear, denominada carioteca, com numerosos poros. No núcleo são encontrados os cromossomos lineares, compostos por DNA em hélice, de natureza nucleoproteica. Contêm também RNA, com a função de transmitir as informações genéticas do DNA ao resto da célula. Ainda dentro do núcleo encontram-se o nucléolo, um corpúsculo esférico que contém DNA, RNA e proteínas, sendo este corpúsculo o sítio de produção do RNA ribossomal. Durante a divisão celular, observa-se que a membrana desaparece, após a mitose a membrana celular é novamente sintetizada (Gompertz, *et al.*, 2015).

As características dos fungos são muito distintas e há justificativa para a serem considerados como um reino separado, baseado em nutrição, material de armazenamento, bioquímica da parede celular, padrão de crescimento, continuidade protoplasmática, anastomose da hifas e plasticidade genética (Manoharachary *et al.*, 2016).

A identificação dos fungos baseia-se principalmente nas suas características morfológicas, e apresentam uma variedade grande de tipos morfológicos, desde os mais simples aos mais complexos (Gompertz *et al.*, 2015).

Basicamente, os fungos incluem as leveduras, os bolores e os cogumelos, que são fungos macroscópicos. Os bolores e as leveduras, são fungos microscópicos, quando crescem em substrato adequado, podem formar colónias visíveis a olho nu com diferenças macroscópicas. Os bolores formam colónias filamentosas, dos mais variados tipos morfológicos e com uma variedade grande de pigmentos, são multicelulares e sua unidade estrutural é representada pela hifa. Já as leveduras, podem apresentar colónias de cor creme, branca, preta, rosa, dependendo da espécie, são unicelulares, e não apresentam diferença entre a parte vegetativa e reprodutiva (Gompertz *et al.*, 2015).

Assim sendo, os fungos possuem dois tipos morfológicos, as leveduras as quais são unicelulares e que se reproduzem assexuadamente, e os bolores, ou fungos filamentosos, os quais são pluricelulares e se reproduzem sexuada ou assexuadamente. Embora a maioria dos fungos seja encontrada em apenas uma dessas duas formas (filamentosa/miceliar ou levedura), alguns deles, clinicamente importantes, podem existir sob ambas as formas, sendo denominados fungos dimórficos (Hofling e Gonçalves, 2008; Murray, 2018; Murray *et al.*, 2014).

Todos os fungos podem existir como heterotróficos ou saprófitas (organismos que se nutrem de materiais mortos ou em decomposição), simbiontes (organismos que vivem em conjunto com benefício mútuo), comensais (quando vivem em estreita relação onde apenas um organismo é beneficiado e o outro prejudicado) ou como parasitas (organismos que prejudicam o hospedeiro, ao obterem nutrientes dos seus tecidos). Alguns podem ser considerados patogénicos para humanos ou animais. Além disso, muitos fungos, através da fermentação e síntese de antibióticos, também podem beneficiar a vida humana (Black, 2002; Murray *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2016).

Os fungos de forma geral são quimiorganotróficos, apresentando necessidades nutricionais relativamente simples. Alimentam-se através da secreção de enzimas extracelulares que digerem materiais poliméricos, como polissacarídeos ou proteínas, em monómeros que são assimilados como fontes de carbono e energia (Madigan, *et al.*, 2016). Sendo o seu metabolismo heterotrófico, os fungos são bioquimicamente versáteis, na produção primária (ex: ácido cítrico, etanol e glicerol) e metabólitos

secundários (ex: antibióticos e aflatoxinas). A maioria dos fungos apresenta respiração aeróbia, embora alguns sejam anaeróbios facultativos (fermentadores) e outros seja estritamente anaeróbios, são de crescimento lento, com tempo de duplicação celular de horas em vez de minutos. São capazes de reproduzir-se pela formação de esporos, que podem ser sexuados (envolvendo meiose, precedida por fissão de protoplasma e fusão dos dois núcleos compatíveis) ou assexuados (envolvendo somente mitose) (Murray *et al.*, 2014).

A temperatura de crescimento abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. Os fungos de importância clínica, em geral, são mesófilos, apresentando temperatura ótima entre 20°C e 30°C. Os fungos podem ter morfologia diferente, segundo as condições nutricionais e a temperatura de seu desenvolvimento. O fenômeno de variação morfológica mais importante em micologia médica é o dimorfismo fúngico, que se expressa por um crescimento micelial entre 22°C e 28°C e leveduriforme entre 33°C e 37°C (Gompertz *et al.*, 2015).

A classificação dos fungos é baseada principalmente em critérios morfológicos, reprodutivos e fisiológicos, e os mesmos são agrupados pelas características comuns em níveis taxonômicos, sendo que cada nível apresenta um nome seguido de sufixo especial: *Phylum* ou filo; Sufixo *mycota*; Subdivisão: sufixo *mycotina*; Classe: sufixo *mycetes*; Ordem: sufixo *ales*; Família: sufixo *aceae*; Género e espécie: sem radicais específicos. Assim, para todos os países do mundo, a classificação dos fungos segue uma mesma metodologia, tal como para outros grupos botânicos (Putzke e Putzke, 2013; Gompertz *et al.*, 2015).

Atualmente, a taxonomia dos fungos tem apresentado progressos expressivos baseados em técnicas moleculares principalmente a prova de reação em cadeia da polimerase (PCR) e seleção de oligonucleotídeos com sondas específicas. A biologia molecular tem ajudado a solucionar complexos agrupamentos taxonômicos e permitido um melhor conhecimento das relações evolutivas.

i. Fungos endofíticos

O termo “endófito” é derivado do grego, *endon* que significa, dentro e *phyte*, que significa, planta. Foi introduzido pela primeira vez em 1866 por de Bary e usado amplamente para referir-se a qualquer organismo encontrado nos tecidos das plantas vivas (Hughes, 2016).

Os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos, sendo altamente eficientes em ocupar os mais diferentes nichos da biosfera, sendo encontrados em praticamente todos os ambientes terrestres. A maior biomassa viva no planeta é formada por comunidade microbianas, sendo os microrganismos endofíticos parte integrante dessa comunidade (Prosser *et al.*, 2007; Andreotte *et al.*, 2008).

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de plantas, geralmente nas partes aéreas, como folhas e caule, sem aparentemente causar danos ou qualquer efeito negativo ao seu hospedeiro (Esposito e de Azevedo, 2010). Por esses motivos, os fungos endofíticos, diferem dos fungos fitopatogénicos, os quais, provocam danos em plantas ou no seu hospedeiro e dos fungos epifíticos, os quais são encontrados na superfície de tecidos e órgãos vegetais. A distinção entre estes microrganismos, incluindo fitopatogénios, é puramente didática, pois seu estado irá depender do estágio de desenvolvimento e de condições ambientais e da planta. Os fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio intimamente relacionadas com plantas também são considerados microrganismos endofíticos (Azevedo, 1998; Souza *et al.*, 2004).

Por definição, um fungo endofítico vive na forma micelial em associação biológica com plantas vivas pelo menos por algum tempo. Portanto, o requisito mínimo antes de um fungo ser denominado como endófito deve ser a demonstração de suas hifas no tecido vivo. A relação simbiótica benéfica para o endófito é que a planta hospedeira é capaz de fornecer nutrientes e compostos necessários para o endófito completar seu ciclo de vida (Kaul *et al.*, 2012).

Os endófitos pertencem a diversos grupos taxonômicos, tais como grupos bacterianos, fúngicos, protistas, arcaicos e geralmente são considerados mutualistas (Hallmann *et al.*, 2011). Endófitos podem ser reconhecidos como (1) Clavicipitaceae endofítica; (2) endófitos fúngicos de dicotiledóneas; (3) fungos endofíticos (4) outros endófitos fúngicos sistêmicos; (5) endófitos fúngicos de líquenes; (6) fungos endofíticos de briófitas e samambaias; (7) fungos endofíticos de casca de árvore; (8) endófitos fúngicos do xilema; (9) endófitos fúngicos da raiz; (10) endófitos fúngicos de galhas e cistos; (11) endófitos procarióticos de plantas (inclui bactérias endofíticas e actinomicetos) (Stone; Bacon; White, 2000).

Estima-se que existam mais de 1 milhão de espécies fúngicas endofíticas em comparação com a existência de um número de espécies de plantas vasculares na proporção de 1: 4-5 fungos por planta (Sun e Guo, 2012).

Os critérios para isolamento de endófitos está diretamente relacionado com o isolamento das moléculas bioativas, da planta e sua molécula bioativa, do composto envolvido, da natureza endêmica da planta e seu ambiente (Tiwari, 2015). Geralmente os endófitos são isolados de tecidos desinfetantes de superfície cultivados em meio sintético e podem ou não conter extratos de tecidos de hospedeiros, no entanto, o meio pode não suportar o crescimento de parasitas obrigatórios, resultando em não obter informações tais endófitos (Ganley e Newcombe, 2006; Hata e Sone, 2008; Pirttilä, *et al.*, 2008).

A identificação de fungos endofíticos é feita como a usada para a identificação de fungos, usando características morfológicas de colônias, hifas vegetativas e esporos assexuais ou sexuais (desenvolvimento de conídios, tamanho forma e fixação de conídios) (Nagamani *et al.*, 2006).

Com o surgimento de ferramentas e técnicas de biologia molecular, tornou-se viável caracterizar esses microrganismos com base em seus marcadores moleculares e estabelecer sua identidade. Foi somente após o uso de ferramentas de biologia molecular que muitos mais endófitos puderam ser identificados (Duong *et al.*, 2006).

Essas ferramentas estão ganhando importância no estabelecimento de relacionamento filogenético (Duong *et al.*, 2006; Sun e Guo, 2012).

a) Compostos bioativos pelos endófitos

Os fungos endofíticos estão associados a descoberta de diversos novos compostos naturais de interesse para a agricultura e indústria, bem como, para a saúde, e tem sido cada vez mais explorados pela comunidade científica (Kozłowska, M. *et al.*, 2015). O exemplo clássico da comprovada relação na produção de compostos bioativos pelos endófitos presentes nas plantas é o taxol, produzido por plantas do género *Taxus* e também obtido de um endófito de *Taxus mairei*, o fungo *Tubercularia* sp. (Wang *et al.*, 2000).

Os fungos endofíticos apresentam interessante produtividade, sendo capazes de produzir diversas classes de substâncias antimicrobianas. Estes microrganismos são capazes de produzir toxinas, fatores de crescimento, substâncias antimicrobianas e muitos outros produtos de interesse biotecnológico. Ainda, exercem importantes funções no hospedeiro, como permitir maior resistência às condições de stress, produção de fitohormonas e proteção contra doenças (Azevedo *et al.*, 2000; Santos e Varavallo, 2011; Mousa e Raizada, 2013).

Uma diversidade de metabolitos secundários com atividade antimicrobiana, são produzidos por fungos endofíticos e podem ser citados como: compostos alifáticos, compostos fenólicos (fenóis e ácidos fenólicos, derivados da isocumarina, flavonoides e lignanas, quinonas), alcaloides (derivados do indol, aminas e amidas), peptídeos, policetídeos, esteroides, terpenoides (principalmente sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos) (Mouza e Raizada, 2013).

Uma vasta gama de hospedeiros já foi investigada com vista à prospecção de fungos endofíticos, o que inclui culturas alimentares (Gonzaga *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*,

2015), plantas tóxicas (Souza *et al.*, 2004) e plantas medicinais (Siqueira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2015).

A investigação de microrganismos pelas indústrias farmacêutica e alimentícia para obter diferentes compostos de interesse ainda é modesta. Antioxidantes tornaram-se o tópico de interesse recentemente, no entanto, os fungos endófitos representam uma fonte abundante e confiável de novos compostos antioxidantes (Rajamanikyam *et al.*, 2017). Nesse contexto, pretende-se contribuir para o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico dos microrganismos, em especial dos fungos endofíticos isolados do *Rosmarinus officinalis* L.

3. *Rosmarinus officinalis* L.

As plantas aromáticas e condimentos são estudadas há mais de um século em todo o mundo, com o objetivo de elucidar os compostos químicos responsáveis pelos efeitos fisiológicos e atividades contra microrganismos, bem como, os mecanismos pelos quais esses efeitos são manifestados. No entanto, ainda existem muitas divergências nos resultados relatados na literatura, tornando o estudo do *Rosmarinus officinalis* de grande importância (Porte e Godoy, 2001).

A família *Lamiaceae* compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies, distribuídas no mundo, sendo o maior centro de dispersão a região Mediterrânea. A espécie *Rosmarinus officinalis* L., pertencente a família *Lamiaceae*, é um arbusto perene, conhecida popularmente como alecrim, *Rosmarinus officinalis*, apresenta diversos outros sinónimos, como: alecrim-de-cheiro, alecrim-das-hortas, alecrim-da-casa, alecrim-comum, alecrim-verdadeiro e rosmaninho, seu nome em latim, significa “orvalho do mar”, referindo-se ao local de origem desta planta (Porte e Godoy, 2001).

Tem origem na Região Mediterrânea, é cultivado em quase todos os países de clima temperado, de Portugal à Austrália, sendo seus principais produtores, a Itália, Espanha, Grécia, Turquia, França, Portugal, Egito e norte da África. Esta planta possui porte

subarbustivo lenhoso, ereto e pouco ramificado (até 1,5 m de altura), suas folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura (Imagem 1). Apresenta flores azulado-claras, pequenas, de forma tubular e de aromas forte, muito agradável e sabor agridoce (Lorenzi e Matos, 2006).



Imagem 1: Alecrim (<https://www.florafiora.com.br/p/extrato-vegetal-de-alecrim/>)

A composição química pode apresentar variações devido a fatores ambientais e de cultivo das plantas, bem como da forma de extração, e armazenamento, dessa forma, podendo interferir na sua atividade antimicrobiana (Nascimento, *et al.*, 2007).

De acordo com relatos encontrados na literatura, pode apresentar propriedades estomacais, estimulantes, antispasmódica e emenagogas e cicatrizantes (May, *et al.*, 2010). É uma das plantas aromáticas importantes da atualidade, apresentando emprego culinário (utilizado mundialmente como condimento em inúmeros alimentos, capaz de promover um dos aromas mais refrescantes e menos caros), medicinal, farmacêutico, cosmético e industrial (Porte e Godoy, 2001).

i. *Rosmarinus officinalis* L. e conservação de alimentos

Os consumidores estão preocupados com o efeito negativo dos produtos químicos sintéticos nos alimentos, e dessa forma, gera-se uma necessidade de encontrar "produtos de rótulo limpo", ampliando o interesse crescente em usar extratos naturais como alternativas para aditivos sintéticos. Os aditivos naturais, devido a sua sinergia com outros métodos de preservação, são considerados seguros, e possuem propriedades específicas como antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos (Nieto *et al.*, 2011; Mahian e Sani, 2016; Nieto, 2017).

A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos, tem mostrado interesse no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias considerando a sua inclusão nos chamados sistemas de bioconservação de alimentos. Estes são referidos como um procedimento natural capaz de promover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos (Trajano *et al.*, 2009).

O extrato de alecrim pode ser útil para substituir ou mesmo diminuir os antioxidantes sintéticos nos alimentos. Como conservantes, os extratos de alecrim oferecem várias vantagens e benefícios tecnológicos para os consumidores, eles têm sido utilizados na conservação de alimentos, pois impedem a oxidação e a contaminação microbiana (Nieto, 2011; Nieto, *et al.*, 2012; Djenane *et al.*, 2002).

ii. *Rosmarinus officinalis* L. e atividade antimicrobiana

Vários estudos têm relatado que extratos de alecrim apresentam atividades biológicas, como hepatoprotetor, antifúngico, inseticida, antioxidante e antibacteriano. É bem conhecido que as propriedades biológicas do alecrim são principalmente devido a compostos fenólicos. No entanto, é essencial ter em conta que estas propriedades biológicas dependem de diferentes aspectos (Nieto, *et al.*, 2018).

As propriedades antioxidantes do alecrim podem ser atribuídas à presença de rosmanol, diterpenos, rosmaridifenol e rosmariquinona e as propriedades antimicrobianas parecem

estar relacionadas com a presença de borneol, α -pineno, cineol e cânfora (Porte e Godoy, 2001, Jiang, 2019). Os componentes bioativos do alecrim contém ácidos fenólicos e diterpenos incluindo ácido carnósico, carnosol, ácido cafeico e seus derivados (isto é, ácido rosmarínico) e flavonóides (apigenina, diosmina, luteolina) e taninos (Jiang, 2019).

Atividades antimicrobianas de óleos essenciais de plantas são conhecidas há séculos, mas o seu sabor forte e característico limitou seu uso em alimentos (Beuchat e Golden, 1989; Farbood, MacNeil e Ostovar, 1976). Nos últimos anos, os extratos vegetais foram desenvolvidos e utilizados em alimentos antioxidantes. Esses extratos contêm uma ampla gama de compostos fenólicos, como os diterpenos abietano, carnosol e ácido ursólico, e podem ter propriedades antimicrobianas, além de sua atividade antioxidante (Collins e Charles, 1987; Lee *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2012).

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e dos seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente, em relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes em alimentos (Souza *et al.*, 2004; Mahian e Sani, 2016).

Haida *et al.*, (2007), demonstram que os extratos de *Rosmarinus officinalis* apresentaram ação contra as bactérias de Gram positivo como *Staphylococcus aureus*. Porém, as concentrações de alecrim que exercem os efeitos antibacterianos desejados são maiores que as utilizadas em alimentos para propósitos flavorizantes. (Porte e Godoy, 2001). Calo *et al.*, (2015) apontam que microrganismos de Gram positivo parecem ser muito mais suscetíveis a óleos essenciais do que organismos de Gram negativo.

Estudos demonstram que bactérias Gram positivo apresentam uma maior sensibilidade frente a óleos essenciais, quando comparadas com Gram negativo. Isso ocorre devido à membrana de LPS, encontrada na parede das bactérias Gram negativo, que proporcionam uma maior resistência, dificultando a entrada e acumulação de óleo essencial na célula bacteriana (Barbosa *et al.*, 2015; Sivasothy *et al.*, 2011).

Em estudo, Sirocchi *et al.*, (2017) mostraram que a combinação entre o óleo essencial de alecrim e a embalagem de atmosfera modificada, também podem ter aplicações importantes na indústria de embalagens de alimentos, visando prolongar o prazo de validade da carne fresca.

Santomauro *et al.*, (2017) mostraram atividade microbicida dos compostos testados em diferentes concentrações, onde o extrato de alecrim, mostrou maior eficácia do que os outros compostos, em particular contra *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, sugerindo que o extrato de alecrim, muitas vezes presente como um antioxidante natural nos alimentos, também pode ser proposto como um desinfetante natural no campo alimentar.

III. ENQUADRAMENTO METODOLÓGICO

1. Objetivos do estudo

i. Objetivo Geral

Isolar os fungos endofíticos do alecrim.

ii. Objetivos Específicos

- a) Identificar os fungos endofíticos do alecrim;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos do alecrim.

2. Tipo de estudo

Esta é uma pesquisa qualitativa, a qual foi desenvolvida na Universidade de Passo Fundo (UPF), na cidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul (RS), Brasil, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Curso de Farmácia e Laboratórios do Parque Científico e Tecnológico do Planalto Médio – Laboratório do Projeto NUTRA-ALI.

3. Colheita do material vegetal

As amostras de material vegetal foram colhidas em dois diferentes locais (horta residencial e quinta de alecrim) em Passo Fundo, RS, Brasil. Após a colheita, o material foi encaminhado para a identificação botânica e registrado no herbário Rio Grande do Sul (RSPF) do Museu Zoobotânico Augusto Ruschi (MUZAR), onde ambas as amostras coletadas se trataram da mesma espécie, *Rosmarinus officinalis*, onde a amostra de horta residencial ficou com registro RSPF 14562 (coordenadas geográficas S 28° 15' 49.3'' / WO S2° 23'58.6'') e a amostra de plantação com registro de RSPF

14592 (coordenadas geográficas -28.289665, - 52.364830). Ambas as amostras foram coletadas no mês de março de 2019.

4. Isolamento de fungos endófitos

Após colheita, foi parafinado o pecíolo do material vegetal. O material colhido foi lavado em água corrente e desinfetado com água destilada estéril por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos, novamente em etanol 70% por 30 segundos e para finalizar em água destilada estéril por 6 minutos (Azevedo e Melo, 1998).

Após a assepsia, o material vegetal foi fragmentado em pedaços de 0,5 cm² utilizando um bisturi estéril (Imagem 2) e transferido para placas de Petri contendo os meios de cultura PDA (Agar Batata Dextrose) (Imagem 3, 4, 5, 6, 7 e 8).



Imagem 2: Amostra de alecrim parafinado e fragmentado



Imagem 3: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 3 dias de incubação



Imagem 4: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 3 dias de incubação

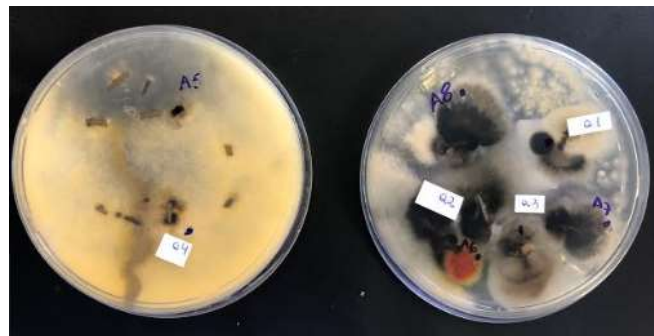


Imagem 5: Amostras de alecrim (quinta de alecrim) com 5 dias de incubação



Imagem 6: Amostras de alecrim (horta residencial) com 3 dias de incubação



Imagem 7: Amostras de alecrim (horta residencial) com 3 dias de incubação

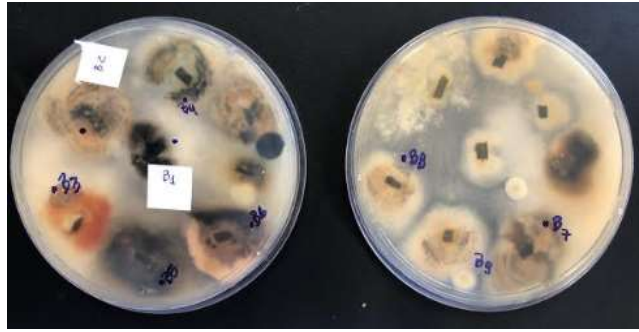


Imagem 8: Amostras de alecrim (horta residencial) com 5 dias de incubação

As amostras de material foram incubadas por 6 dias a 35°C, sendo observadas diariamente para realização dos repiques e isolamento dos fungos crescidos. Todos os fungos que apresentaram diferenças morfológicas macroscópicas foram isolados.

5. Identificação de fungos endófitos

Para a identificação dos fungos endófitos foi realizado o cultivo dos mesmos, onde inicialmente foram montados kits para cultivo (Imagem 9) contendo 1 Placa de Petri, 2 lâminas, 1 lamínula e 1 pequeno aglomerado de algodão, hidratado com água estéril, onde cada kit foi autoclavado. Após autoclavagem, foi transferido para os kits, 1 pedaço quadrangular de 2 cm x 2 cm, de meio Ágar Batata Dextrose (PDA) sólido, o qual foi inserido acima das lâminas. Após o preparo do meio para o microcultivo, foram separadas as amostras de cada fungo já previamente repicado, e realizou novo repique dos fungos com fio estéril, nas 4 laterais do meio PDA cortado em quadrado e posteriormente inserido a lamínula em cima do quadrado de PDA com os fungos já repicados (Imagem 10 e 11). Após as amostras em microcultivo, foram colocadas em estufa a 25°C por 3 dias. Posteriormente realizou-se a retirada da lamínula, com pinça estéril, do cultivo em PDA, e posteriormente a coloração com corante azul de lactofenol. Foram observados os aspectos macro e micro morfológicos dos fungos isolados e comparados com literatura específica (Watanabe, 2002).

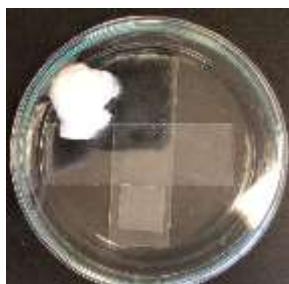


Imagem 9: Kit estéril para cultivo



Imagem 10: Fungo com 1 dia de incubação

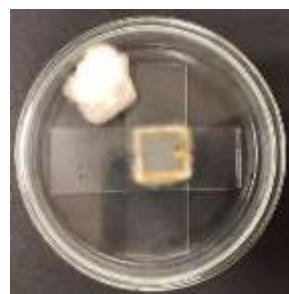


Imagem 11: Fungo com 3 dias de incubação

6. Inoculação dos fungos endófitos em Ágar Batata Dextrose (PDA)

Os fungos endófitos foram inoculados em placas de Petri com meio PDA e incubados em estufa a 35°C por 7 dias (Imagem 12, 13, 14 e 15).



Imagem 12: 48 horas de incubação



Imagem 13: 72 horas de incubação



Imagem 14: 96 horas de incubação



Imagem 15: 120 horas de incubação

7. Atividade antimicrobiana dos fungos endófitos

Para o teste de atividade antimicrobiana, inicialmente realizou-se a inoculação de cada fungo previamente isolado em Placas de Petri com meio PDA. Em triplicata, em placas de Petri com meio Ágar Mueller-Hinton (MH), realizou-se a abertura de poços, onde o meio foi perfurado ao centro com perfurador e retirado o ágar com o auxílio de pinça estéril. Após a preparação e perfuração do meio, amostra de cada fungo previamente isolado foi adicionada ao poço, de forma individual em cada placa e incubado em estufa a 25°C por 3 dias (Imagem 16 e 17).



Imagem 16: Fungo - 2º dia incubação



Imagem 17: Fungo - 3º dia incubação

Durante os dias de incubação dos fungos, realizou-se a repicagem das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, as quais já haviam sido repicadas em meio MH sólido e incubadas em estufa a 37°C.

No 1º dia de crescimento as bactérias foram repicadas para meio de caldo MH e incubadas a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, realizou-se a 2ª repicagem das bactérias para meio MH sólido e incubação a 37°C por 24 horas. Para a etapa final de crescimento, no 3º dia foi realizado novo inóculo das bactérias. Após essas etapas, realizou-se o preparo da padronização da suspensão dos microrganismos patogênicos de interesse alimentar (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) a serem testados. Para o preparo da suspensão bacteriana foram transferidas colônias de cada microrganismo, com alça de inoculação, para tubo de ensaio com água com cloreto de sódio a 0,9%, ajustando-se a turbidez do inóculo até a turvação comparativa a 0,5 da escala de McFarland.

Os microrganismos patogênicos já padronizados em suspensão, foram então repicados para as placas que continham as amostras de fungos já incubados. A inoculação realizou-se por meio de estrias, de cada microrganismo a ser testado em meio MH já com o fungo incubado ao centro da placa.

As placas foram então armazenadas em estufa a 37°C por 24h, e após este período foi realizada a leitura das placas, observando a presença ou ausência de crescimento contínuo de estrias dos microrganismos patogênicos ou crescimento com espaçamento dos microrganismos patogênicos ou ausência de crescimento das estrias (Imagem 18).

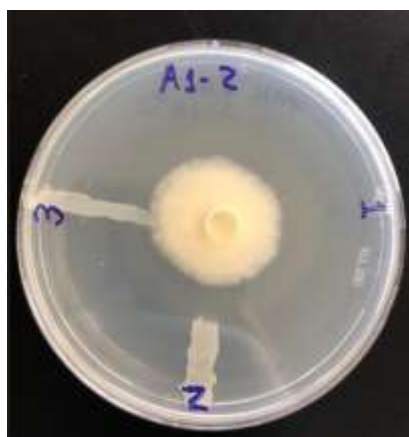


Imagem 18: Resultado do confronto entre fungos endófitos e microrganismos patogénios de uma das amostras testadas

IV. RESULTADOS

1. Caracterização da amostra

Do material vegetal do alecrim colhido numa quinta e horta residencial, foram isolados 17 fungos endofíticos, sendo estes, 9 fungos da amostra de alecrim colhida da horta residencial e 8 fungos isolados da amostra de alecrim colhida da quinta. Os fungos isolados foram repicados inicialmente em meio PDA, e posteriormente, para a etapa de triagem e avaliação de atividade antimicrobiana, em meio MH.

2. Identificação Macroscópica

Relativamente dos 17 fungos isolados colhidos a partir das amostras de alecrim da horta residencial e quinta para a identificação macroscópica foram observados fungos de diferentes características morfológicas, coloração/pigmentação e texturas. Ainda, se observou diferença em relação a velocidade de crescimento dos diferentes fungos. As imagens da macroscopia dos fungos isolados no presente estudo por tipo de amostra e tempo de crescimento em dias estão apresentadas no Anexo 1 (Imagens 25 a 41).

3. Identificação Microscópica

Para a identificação microscópica, dos 17 fungos isolados colhidos a partir das amostras de alecrim da horta residencial e quinta, foi possível realizar identificação de 8 fungos, estando os fungos identificados isolados da amostra de alecrim colhida numa quinta apresentados na Tabela 1 e os fungos identificados isolados da amostra de alecrim colhida numa horta residencial apresentados na Tabela 2. As suas respectivas imagens, estão apresentadas no Anexo 2 (Imagens 42 a 58).

Tabela 1: Identificação microscópica de fungos endófitos isolados do alecrim (A = amostra de alecrim colhida numa quinta)

Amostra	Género/Estrutura
A1	<i>Aspergillus</i>
A2	<i>Alternaria</i>
A3	Micélio estéril
A4	<i>Penicillium</i>
A5	Micélio estéril
A6	<i>Absidia</i>
A7	Micélio estéril
A8	Micélio estéril

Tabela 2: Identificação microscópica de fungos endófitos isolados do alecrim (B = amostra de alecrim colhida numa horta residencial)

Amostra	Género/Estrutura
B1	Micélio estéril
B2	<i>Acremonium</i>
B3	Micélio estéril
B4	<i>Acremonium</i>
B5	Micélio estéril
B6	Micélio estéril
B7	<i>Acremonium</i>
B8	Não identificado o tipo de estrutura presente
B9	<i>Chaetomium</i>

4. Atividade Antimicrobiana dos fungos endófitos

Para o resultado da avaliação da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados das amostras de alecrim (amostra A = amostra de alecrim colhida numa quinta, amostra B = amostra de alecrim colhida numa horta residencial), realizadas em triplicata, considerou-se atividade alta (+ A), atividade baixa (+ B) e sem atividade (-). Estes resultados estão demonstrados com exemplos de alguns dos fungos isolados colhidos a partir das amostras de alecrim da horta residencial e quinta nas imagens 19, 20, 21, 22, 23 e 24 e apresentados em sua totalidade na Tabelas 3 e Tabela 4. As

amostras em triplicata que não estão inseridas na tabela, foram desconsideradas da avaliação por contaminação durante o procedimento, impossibilitando interpretação dos resultados.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana de fungos endófitos isolados do alecrim (A = amostra de alecrim colhida numa quinta), para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

Amostra A	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
A1-2	+ A	+ B	-
A1-3	+ B	-	-
A2-1	-	-	-
A2-2	-	-	-
A2-3	-	-	-
A3-1	-	-	-
A3-2	-	-	-
A3-3	-	-	-
A4-1	+ A	+ B	+ B
A4-2	+ A	+ B	+ B
A4-3	+ A	+ B	+ B
A5-1	-	+ B	não cresceu
A5-2	-	+ B	não cresceu
A6-1	-	-	-
A6-2	-	-	-
A6-3	-	-	-
A7-1	+ B	-	-
A7-2	-	-	-
A7-3	-	-	-
A8-1	-	-	-
A8-2	-	-	-
A8-3	+ A	+ B	-

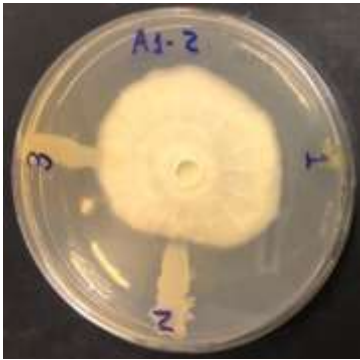


Imagem 19: A1-2



Imagem 20: A4-3



Imagem 21: A5-2

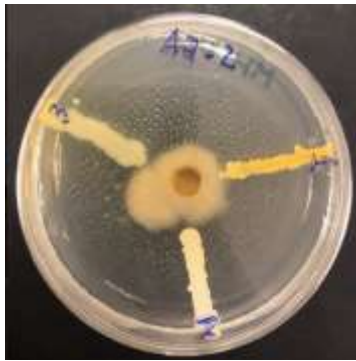


Imagem 22: A7-2

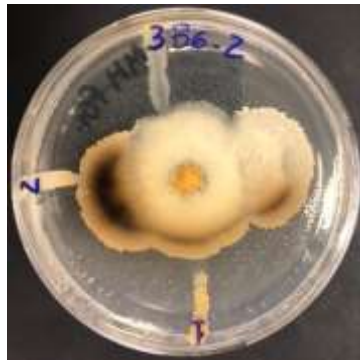


Imagem 23: B6-2

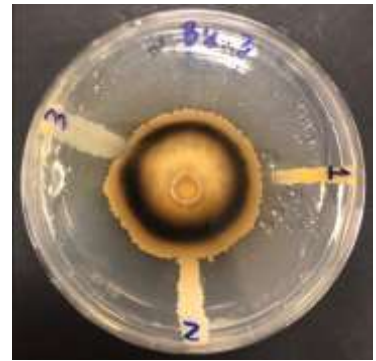


Imagem 24: B8-3

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de fungos endófitos isolados do alecrim (B = amostra de alecrim coletada numa horta residencial), para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

Amostra B	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
B2-2	-	-	-
B2-3	+ B	-	-
B3-1	-	-	-
B3-2	-	-	-
B3-3	-	-	-
B4-1	+ B	-	-
B4-2	+ B	-	-
B5-1	-	-	-
B5-2	-	+ B	-
B5-3	-	-	-
B6-1	+ B	-	-
B6-2	+ B	-	-
B7-1	+ B	-	-
B7-2	+ B	-	-
B7-3	+ B	-	-
B8-1	-	+ B	não cresceu
B8-2	-	+ B	não cresceu
B8-3	-	+ B	não cresceu
B9-1	+ B	-	-
B9-2	+ B	-	-
B9-3	-	-	-

Analisando os resultados apresentados na tabela 1, os resultados mais promissores em relação a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados do alecrim, da amostra A (amostra de alecrim coletada numa quinta), foram principalmente para a amostra A4, a qual apresentou alta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e baixa atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. A amostra A1, apresentou atividade antimicrobiana alta para *Staphylococcus aureus* e baixa para *Escherichia coli*. A amostra A5, apresentou baixa atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*. Uma das amostras A7, apresentou baixa atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*. Ainda, uma das amostras A8, apresentou

alta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e baixa atividade para *Escherichia coli*.

Já para os resultados apresentados na tabela 2, da amostra B (amostra de alecrim colhida numa horta residencial), nenhuma amostra apresentou alta atividade antimicrobiana para os microrganismos testados. No entanto, as amostras B4, B6, B7 e B9, apresentaram atividade antimicrobiana baixa para *Staphylococcus aureus*. Uma das amostras B2, também apresentou atividade antimicrobiana baixa para *Staphylococcus aureus*. As amostras B8, apresentaram atividade antimicrobiana baixa para *Escherichia coli*. Uma das amostras B5, também apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*.

Dessa forma, com os presentes resultados identificou-se atividade antimicrobiana alta em apenas umas das amostras para microrganismo Gram positivo (*Staphylococcus aureus*). No entanto, também pode-se observar atividade antimicrobiana, embora baixa, para microrganismos Gram negativo (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*).

V. DISCUSSÃO

As atividades antimicrobianas de algumas espécies de plantas, tem sido amplamente pesquisadas, onde algumas ervas exibem propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de bactérias Gram positivo e Gram negativo, incluindo as da espécie *Rosmarinus officinalis*.

Um estudo que avaliou a composição química e atividade antibacteriana de algumas plantas medicinais da família Lamiaceae, mostrou que as estirpes de *Staphylococcus aureus*, foram as bactérias mais sensíveis a extratos aquosos (etanólicos e metanólicos) de alecrim, sálvia e extrato aquoso de tomilho metanólico (Kozłowska, *et al.*, 2015).

Haida *et al.*, (2007), demonstram que os extratos de *Rosmarinus officinalis* apresentaram ação contra as bactérias de Gram positivo como *Staphylococcus aureus*.

Ainda, verificaram que nenhum dos extratos de alecrim utilizados apresentaram resultado positivo para a inibição do crescimento de *E. coli*. Concordante com presente estudo, o qual também verificou atividade antimicrobiana (alta e baixa atividade antimicrobiana) para o microrganismo *Staphylococcus aureus*. No entanto, o presente estudo observou atividade, mesmo que baixa atividade, para *E. coli*, em 6 diferentes tipos de amostras avaliadas, resultados discordantes do estudo citado anteriormente.

Santomauro *et al.*, (2017) mostraram atividade microbicida dos compostos testados em diferentes concentrações, onde o extrato de alecrim, mostrou maior eficácia do que os outros compostos, em particular contra *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, sugerindo que o extrato de alecrim, muitas vezes presente como um antioxidante natural nos alimentos, também pode ser proposto como um desinfetante natural no campo alimentar. Já o presente estudo, verificou baixa atividade antimicrobiana contra *E. coli*, em 6 tipos de amostras testadas.

Hentz e Santin (2007), ao realizarem a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis l.*) contra *Salmonella sp.* concluíram que o óleo essencial comercial de alecrim inibiu a *Salmonella sp.* apenas na sua forma pura (sem diluição). A metodologia empregada no estudo citado utilizou o óleo essencial de alecrim em sua forma pura e por meio de diluição decimal seriada (10^{-1} a 10^{-7}). Apesar das diferentes metodologias empregadas, entre o estudo citado e o presente, os resultados podem ser considerados semelhantes, uma vez que dentre todas as amostras avaliadas do presente estudo, apenas um tipo de amostra apresentou baixa atividade antimicrobiana para a *Salmonella typhimurium*. Nesse contexto, sugere-se, como trabalho futuro, a identificação dos compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos endofíticos e análise comparativa com a cromatografia de óleo essencial de alecrim, com vista a determinar se existirá co-extração dos primeiros quando da destilação do óleo essencial.

Em 2000, Del Campo, *et al.*, demonstraram que o extrato de rosmarynho não teve nenhum efeito sobre as bactérias Gram negativo *E. coli* e *Salmonella enteritidis*, enquanto que o crescimento das bactérias Gram positivo, *Staphylococcus aureus*, *L.*

monocytogenes, *B. cereus*, *L. mesenteroides* e *S. mutans*, foram inibidos. Resultados estes semelhantes ao do presente estudo, em relação aos microrganismos testados *E. coli* e *S. aureus*.

Sienkiewicz *et al.*, (2013), demonstraram as atividades antibacterianas do manjeriço (*Ocimum basilicum*, L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*, L.), onde relataram a inibição de crescimento microbiano por ambos os óleos essenciais, onde ambos os óleos essenciais testados foram ativos contra as estirpes de *E.coli*. Assim como, Mihajilov-Kristev *et al.*, 2009, mostraram que os óleos essenciais contendo principalmente carvacrol (67%), e γ -terpineno (15,3%) se mostraram eficazes contra as estirpes incluindo *E.coli*, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 0,025 μ l/mL a 0,78 μ l/mL de acordo com o método de microdiluição em caldo. Ainda, em 2006, Prabuseenivasan *et al.*, confirmaram que o óleo essencial de alecrim inibe fortemente *E. coli* (ATCC 25922). Apesar das distintas metodologias, os resultados podem ser considerados concordantes com o do presente estudo, onde mesmo que, baixa atividade, para *E coli*, a mesma foi verificada dentre 6 diferentes tipos de amostras avaliadas. Assim sendo, sugere-se a possibilidade de novos estudos, como referido anteriormente, que visem a análise da co-extração de compostos presentes na planta e nos fungos endofíticos, durante a extração do óleo essencial.

Em 2004, Burt, mostrou atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim contra, *E. coli*, *B. cereus* e *Staphylococcus aureus*. Assim como, Gómez-Estaca *et al.*, (2010), relataram que o óleo essencial de alecrim inibiu totalmente o crescimento de *Salmonella choleraesuis*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila* e *Photobacterium phosphoreum*, bactérias estas que contribuem para deterioração dos alimentos e patogénios alimentares.

Calo *et al.*, (2015) apontam que microrganismos de Gram positivo parecem ser muito mais suscetíveis a óleos essenciais do que organismos de Gram negativo, resultados que corroboram com os dados do presente estudo, onde para o microrganismo testado gram positivo (*Staphylococcus aureus*), os fungos endofíticos, isolados do alecrim,

apresentaram maior número de atividade antimicrobiana (baixa), quando comparados com os microrganismos Gram negativo testado. Ainda, as amostras que apresentaram atividade antimicrobiana alta, foram somente para o microrganismo Gram positivo testado.

Estudos desenvolvidos por Barbosa *et al.*, (2015) e Sivasothy *et al.*, (2011) também demonstraram que bactérias Gram positivo apresentam uma maior sensibilidade frente a óleos essenciais, quando comparadas com Gram negativo, o que ocorre devido à membrana de externa e aos lipopolissacarídeos, encontrados na parede das bactérias Gram negativo, que proporcionam uma maior resistência, dificultando a entrada e acumulação de óleo essencial na célula bacteriana.

Os estudos de Sousa e Conceição (2007), testaram soluções com diferentes concentrações (100%, 50% e 25%) a partir da solução aquosa a 1% de alecrim, onde demonstraram positiva atividade antibacteriana do alecrim frente a *Staphylococcus aureus*, resultados semelhantes aos do presente estudo, apesar da diferente metodologia entre eles.

Pinho *et al.* (2011), ao testarem extratos hidroalcoólicos padrão (EAPs), obtidos a partir das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e do farelo da casca do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*) e a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações desses EAPs contra *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, verificaram que os EAPs obtidos das folhas de alecrim-pimenta e da casca do fruto do pequi não mostraram atividade antimicrobiana, onde citam que a ausência de atividade antibacteriana no presente estudo pode ser decorrente da concentração do extrato, qualidade das folhas (alterada por condições de solo, sazonalidade, tipo de colheita e teor de ativos) ou mesmo da menor sensibilidade dos microrganismos estudados aos EAPs avaliados. Resultados estes diferentes do presente estudo, onde apesar de terem analisado amostra de outro tipo de alecrim, levanta importantes questões referentes às condições de solo, sazonalidade, tipo de colheita e teor de ativos. Pensando nesses aspectos, o presente estudo, realizou a colheita de duas amostras diferentes do alecrim, para que pudesse, não apenas identificar e garantir algum tipo de crescimento de fungos

endofíticos de amostras de diferentes localidades, mas também que se pudesse realizar a identificação de diferentes fungos, crescidos a partir das amostras.

Gomez-Estaca, *et al.*, (2010), relataram que o óleo essencial de alecrim inibiu totalmente o crescimento de *Salmonella choleraesuis*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Photobacterium phosphoreum*, bactérias estas consideradas patogênicos alimentares comuns e que contribuem para a deterioração de alimentos. O presente estudo, também verificou, inibição de crescimento para *Staphylococcus aureus*.

Semeniuc, *et al.*, (2017), ao comparar os efeitos antibacterianos de diversos óleos essenciais (EOs), sozinho e em combinação contra diferentes bactérias Gram positivo e Gram negativo, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* evidenciaram que o óleo essencial de tomilho exibiu forte contra *E. coli*, moderado contra *S. typhimurium* e *Bacillus cereus* ou leve efeito inibitório contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* e o óleo essencial de manjeriço mostraram-se leves contra *E. coli* e *Bacillus cereus* ou sem efeitos inibitórios contra *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Friedman, Henika e Mandrell (2002) e Nevas *et al.*, (2004) mostraram que orégão e tomilho tiveram importante atividade antibacteriana em *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *C. perfringens* e *C. botulinum* e que o orégão, canela, tomilho, cravinho da Índia tiveram forte atividade contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *S. entérica*. Resultados estes, mesmo com amostras diferentes avaliadas (tomilho, orégão, entre outras), foram diferentes do presente estudo, o qual demonstrou alta atividade para *Staphylococcus aureus*, em uma das amostras avaliadas e baixa atividade antimicrobiana para *E. coli* e *S. typhimurium*.

As diferentes metodologias e tipos de óleos essenciais ou extratos avaliados bem como as discrepâncias apresentadas entre os resultados observados em estudos já existentes com os obtidos neste estudo, evidenciam a complexidade de comparação com pesquisas anteriores, pois a sensibilidade de estirpes distintas de determinado microrganismo pode

ser diferente para um mesmo produto antimicrobiano vegetal. Por outro lado, nem sempre as metodologias utilizadas são semelhantes.

VI. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os fungos endofíticos extraídos do alecrim possuem atividade antimicrobiana alta e baixa relativamente a *Staphylococcus aureus*, bem como atividade antimicrobiana baixa para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, em algumas amostras avaliadas. Por outro lado, no presente estudo procedeu-se ao isolamento e identificação macroscópica e microscópica de fungos endofíticos de diferentes géneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Absidia*, *Acremonium* e *Chaetomium*, sendo este também um dos objetivos do estudo. Os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização de alecrim para o controlo de bactérias potencialmente patogénicas de origem alimentar.

VII. BIBLIOGRAFIA

Andreotte, F.D. *et alii* (2008). Diversidade Molecular de Microrganismos Endofíticos. *In: Figueiredo, M.V.B. et alii* (Ed). *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Agrolivros, Guaíba, pp. 229-253.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Módulo VII, pp. 1-27. [Em linha]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. [Consultado em 19/04/2018].

Azevedo, J. L. (1998). Ecologia microbiana. *In: Microrganismos Endofíticos*. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, UFGO, Embrapa-CNPMA, 4, pp. 117-137. [Em linha]. Disponível em <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosendofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf>. [Consultado em 11/04/2018].

Azevedo, J. L. *et alii* (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Eletronic Journal of Biotechnology*, 3(1), pp. 40-65.

Basti, A. A. (2006). Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food Control*, 17(3), pp. 183-188.

Barbosa, L. N. *et alli* (2015). In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resitant bactéria. *Journal of Oleo Science*, 64(3), pp. 280-298.

Beuchat, L. R.; Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Techonology*, 43, pp. 134-142.

Bezerra, J. D. P., *et alii* (2015). Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forticata*: Diversity and biotechnological potential. *Journal of Microbiology*, 46(1), pp. 49-57.

Black, J. G. (2002). Microbiologia: fundamentos e perspectivas. *In*: Black, J. G. *Microorganismos eucariontes e parasitas*. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 11, pp. 275-282.

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp. 223-253.

Brasil (2010). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. Brasília, Ed. Ministério da Saúde, pp. 1-160.

Brasil (2011). Food ingredients. Brasil. Microorganismos. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. *Revista FIB*, 19, pp. 50-59. [Em linha]. Disponível em <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060538412001465235849.pdf>. [Consultado em 15/04/2019].

Brasil (2017). Ministério da Saúde. [Em linha]. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. [Consultado em 10/04/2019].

Calo, J. R. *et alii*. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 9(6), pp. 111-119.

Campos, L. C. (2015). Salmonella. *In*: *Microbiologia*. Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 351-360.

CDC – Center for Disease Control and Prevention (2009). Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58, pp.609-615. [Em linha]. Disponível em <<https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6203.pdf>>. [Consultado em 25/05/2019].

Collins, M. A., Charles, H. P. (1987). Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*, 4, pp. 311-315.

Da Cunha, M. L. R. S. (2017). *Staphylococcus aureus*: Infections, Treatment and Risk Assessment. Nova Science Publishers, Nova Biomedical, pp. 1-147.

De Santos, P. E., Monte, A. S. (2012). *Salmonella*: Classification, Genetics and Disease Outbreaks. Hauppauge, N. Y, Nova Science Publishers, pp. 1-284.

Del Campo, J., Amiot, M. J. e Nguyen-The, C. (2000). Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10), pp. 1359-1368.

Djenane, D. *et alii.* (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks displayed in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, pp. 407–415.

Duong, L. M. *et alii.* (2006). DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal endophytes. *Fungal Diversity*, 23, pp. 121-138.

EFSA – European Food Safety Authority (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. 10(3), pp. 1-442. [Em linha]. Disponível em <file:///C:/Users/usuario/Downloads/Authority_et_al-2012-EFSA_Journal.pdf>. [Consultado em 14/05/2019].

Esposito, E., de Azevedo, J. L. (2010). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. In: Lacava, P. T., Sebastianes, F. L. S. e Azevedo, J. L. (Ed). *Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas*. 2. ed. Caxias do Sul, EDUCS, pp. 535-569.

Elias Junior, W. P., Gomes, T. A. T. (2015). *Escherichia coli* Enteroagrativa (EAEC). In: *Microbiologia*. Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 317-322.

Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A Méndez-Vilas, 2. ed, pp. 1143-1156.

Farbood, M. I., MacNeil, J. H. e Ostovar, K. (1976). Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. *J. Milk Food Techonology*, 39(10), pp. 675-679.

Fernandes, E.G., *et alii*. (2015). Diversity of endophytic fungi in *Glicine max*. *Microbiological Research*, 181, pp. 84-92.

Fernández-López, J., Viuda-Martos, M. (2018). Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems. *Foods*, 7(56), pp. 1-4.

Friedman, M., Henika, P. R. e Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), pp. 1545-1560.

Ganley, R. J., Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 110(3), pp. 318-327.

Germano, P. M. I., Germano, M. I. S. (2003). Higiene e vigilância sanitária de alimentos. Qualidade das matérias primas. Doenças transmitidas por alimentos: treinamento de recursos humanos. 2 ed. São Paulo, Varela, pp. 1-629.

Gillois, K. *et alii*. (2018). Review Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives. *Research Centre in Food Toxicology*, 6(2), pp. 53.

Gompertz, O. F. *et alii* (2015). Estrutura, Morfologia, Reprodução e Taxonomia dos Fungos. *In: Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 545-552.

Gomes, T. A. T., Hernandez, R. T. (2015). *Escherichia coli* Enteropatogénica. *In: Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 303-310.

Gómez-Estaca, J. *et alii*. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), pp. 889-896.

Gonzaga, L. L. *et alii*. (2014). Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), pp. 485-496.

Guth, B. E. C. (2015). *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC) *In: Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 323-328.

Haida, K. S. *et alii*. (2007). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arquivo de Ciências da Saúde - UNIPAR*, 11(3), pp. 185-192.

Hallmann, J. A. *et alii*. (2011). Endophytic bacteria in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), pp. 895-914.

Hata, K., Sone, K (2008). Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broad leaf and conifer stands. *Mycoscience*, 49(4), pp. 229-232.

Hentz, S. M., Santin, N. C. (2007). Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella sp.* *Evidência*, Joaçaba, 7(2), pp. 93-100.

Hofling, J. F., Gonçalves, R. B. (2008). *Microscopia de Luz em Microbiologia*. Porto Alegre, Artmed, pp. 1-239.

Hyldgaard, M., Mygind, T. e Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), pp. 1-24.

Hughes, E. (2016). Endophytic Fungi Diversity, Characterization and Biocontrol. *Microbiology Research Advances*. New York, Nova Publishes, pp. 1-163.

Jiang, A. T. (2019). Health Benefits of Culinary Herbs and Spices. *Journal of AOAC International*, 102(2), pp. 395-411.

Kaul, S. *et alii.* (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, pp. 1-20.

Kozłowska, M. *et alii.* (2015). Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae Family. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 72(4), pp. 757-767.

Lee, J. H. *et alii.* (2004). Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. *Food Research International*, 37(10), pp. 967-974.

Lorenzi, H., Matos, F. J. (2006). Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. (Ed) Francisco José de Abreu Matos. 1. ed. Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum.

Madigan, M. T. (2016). *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre, Artmed.

- Mahian, R. A., Sani, A. M. (2016). Essential oils in food systems: A systemic review. *International Journal of Pharm Tech Research*, 9(6), pp. 409-416.
- Manoharachary, C. *et alii* (2016). *Mycology and Microbiology: A Textbook for Ug and Pg Courses*. India, Scientific Publishers.
- Mariutti, L. R. B. *et alii*. (2011). Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. *Journal of Food Science*, 76(6), pp. 909-915.
- Martinez, M. B. (2015). *Escherichia coli* Enteroinvasora (EIEC) In: *Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 323-328.
- May, A. *et alii*. (2010). Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) em função da altura e intervalo entre cortes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 12(2), pp. 195-200.
- McCulloch, J. A., Mamizuca, E. M. (2015). *Staphylococcus aureus* In: *Microbiologia*. Trabulsi, L. R., Alterthum, F. 6. ed. São Paulo, Atheneu, pp. 179-188.
- Mihajilov-Kristev, T. *et alii*. (2009). Antimicrobial activity of Satureja Hortensis L. Essential Oil Against Pathogenic Microbial Strains. *Journal Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(4), pp. 1492-1496.
- Mousa, W. K., Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4(65), pp. 1-18.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (2014). *Microbiologia médica*. 7. ed. Rio de Janeiro, pp. 1-248.
- Nagamani, A. *et alii*. (2006). *Hand book of soil fungi*. I K International, New Delhi. India.

Nascimento, F. C. *et alii* (2007). Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, 17(1), pp. 108-113.

Nevas, M. *et alii*. (2004). Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(1), pp. 199-202.

Newell, D. G. *et alii*. (2010). Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, pp. 3-15.

Nieto, G. *et alii*. (2011). Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology*, 233(1), pp. 11–18.

Nieto, G. *et alii*. (2012). Administration of distillate thyme leaves into the diet of Segureña ewes: Effect on lamb meat quality. *Animal - Cambridge University Press*. 6(12), pp. 2048-2056.

Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae Family. *Medicines*, 4(63), pp. 1-10.

Nieto, G. *et alii*. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5(98), pp.1-13.

Pellegrini, M. *et alii*. (2018). Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application. *Foods*, 7(2), pp. 1-14.

Pinho, L. *et alii*. (2011). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42(2), pp. 326-331.

Pinto, U. M. *et alii.* (2004). Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Revista de Nutrição*, 17(3), pp. 319-326.

Pirttilä, A. M. *et alii.* (2008). Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 95(1), pp. 47-55.

Porte, A., Godoy, R. L. O. (2001). Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 19(20), pp. 193-210.

Prabuseenivasan, S. *et alii.* (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), pp. 1-8.

Prosser, J. I. *et alii.* (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5, pp.384-392.

Putzke, J., Putzke, M. T. L. (2013). Os reinos dos fungos. 3. ed. Santa Cruz do Sul, EDNUISC.

Rajamanikyam, M. *et alii.* (2017). Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology na International Journal*, 60, pp. 1-26.

Rajeev, B. *et alii.* (2017). Optimization of antioxidante efficacy of a deflavored and decolorized Rosemary extract: effect of carnosol content on the oxidative stability of paprika colored beef patties. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), pp. 1665-1677.

Santomauro, F. *et alii.* (2017). The antimicrobial effects of three phenolic extracts from *Rosmarinus officinalis* L., *Vitis vinifera* L. and *Polygonum cuspidatum* L. on food pathogens. *Journal Natural Product Research*, 32(22), pp. 2639-2645.

Santos, T. T., Varavallo, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, 32(2), pp. 199-212.

Satcher, D. (2000). Food safety: a growing global health problem. *JAMA - The Journal of the American Medical Association*, 283(14), pp. 1817-1817.

Sacallan, E. *et alii*. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - Major Patogens. *Emerging Infectious Disease*, 17(1), pp. 7-15.

Semeniuc, C. A. *et alii*. (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), pp. 403-408.

Shinohara, N. K. S. *et alii*. (2008). *Salmonella spp.*, importante agente patogénico veiculados a alimentos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 13(5), pp. 1675-1683.

Sienkiewicz, M. *et alii*. (2013). The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*. 18(8), pp. 9334-9351.

Siqueira, V. M. *et alii*. (2011). Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. And their antimicrobial activity. *Symbiosis*, 53(2), pp. 89-95.

Sirocchi V. *et alii*. (2017). Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chemistry*, 221, pp. 1069-1076.

Sivasothy, Y. *et alii*. (2010). Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, 124(2), pp. 514-517.

Souza, A. Q. L. *et alii*. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 34(2), pp. 185-195.

Sousa, T. M. P.; Conceição, D. M. (2004). Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) *Artigos - Ciências Agrárias*, pp. 19-24.

Stone, J.K., Bacon, C.W e White, J.F. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In: Bacon C. W.; White, J. F. (ed). In: Book *Microbial endophytes*. Dekker, M. Inc. New York, 3, pp 29-33.

Sun, X., Guo, L. D. (2012) Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Journal Mycology an International Journal on Fungal Biology*, 3(1), pp. 65-76.

Suresh, T. *et alii*. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance os *Salmonella enteritidis* and other salmonelas in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 23(3), pp. 294-299.

Tiwari, K. (2015). The future products: endophytic fungal metabolites. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 2(1), pp. 1-7.

Trajano, V. N. *et alii*. (2009). Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(3), pp. 542-545.

Watanabe, T. (2002). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd edn. CRC Press, Florida.

Wang, *et alii*. (2000). Taxol from *Tubercularia sp.* Strain TF5, na endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, 193(2), pp. 249-253.

Wiwanitkit, V. (2011). *Escherichia coli* Infections. *Internal Medical Publishing*. [Em linha]. Disponível em <<https://epdf.pub/escherichia-coli-infections.html>>. [Consultado em 16/06/2019].

WHO – World Health Organization (2002). *Food safety and foodborne illness*. World Health Organization. Fact sheet, 237. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. [Consultado em 04/06/2019].

WHO – World Health Organization (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. [Em linha]. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf;jsessionid=6B658501A5B066B6FB47B1201F3DE741?sequence=1>. [Consultado em 01/02/2018].

Vo, A.T.T. *et alii*. (2006). Distribution of *Salmonella* entérica serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Veterinary Microbiology*, 113(1-2), pp. 153-158.

Zhang, Y. *et alii*. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), pp. 9305-9314.

ANEXOS

Anexo 1: Imagens da macroscopia dos fungos endofíticos isolados

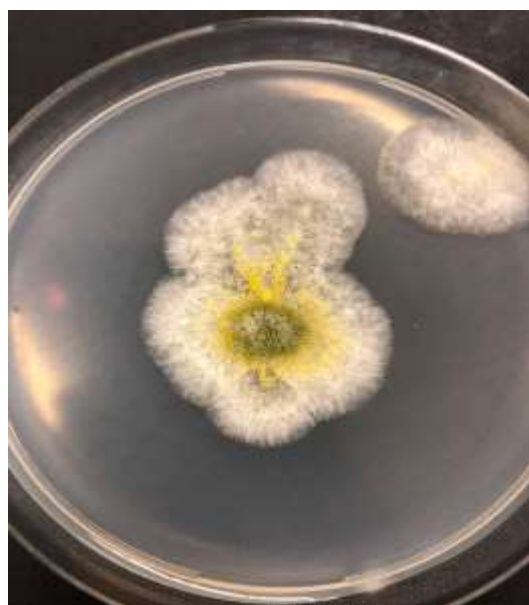
Imagem 25: Fungo endofítico A1 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



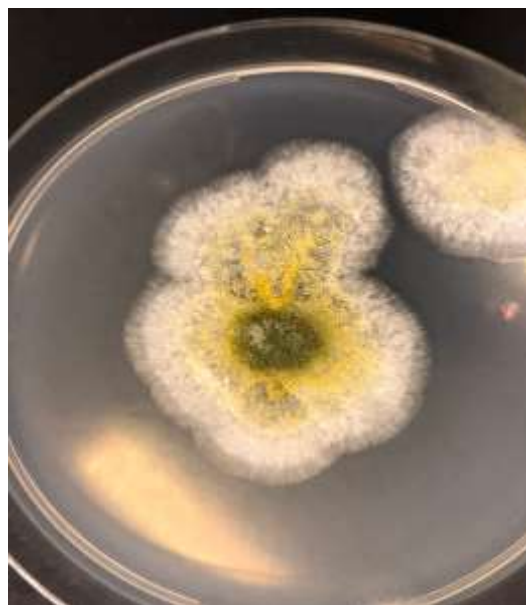
a



b



c

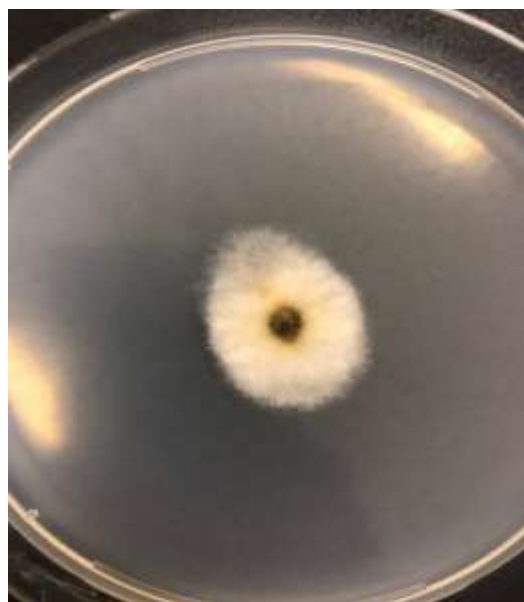


d

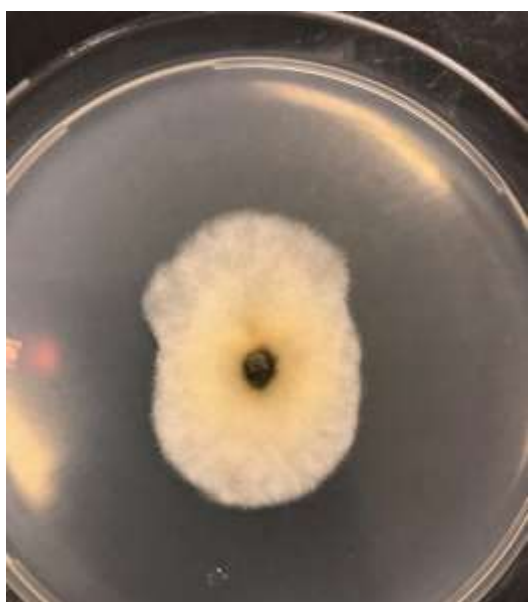
Imagem 26: Fungo endofítico A2 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



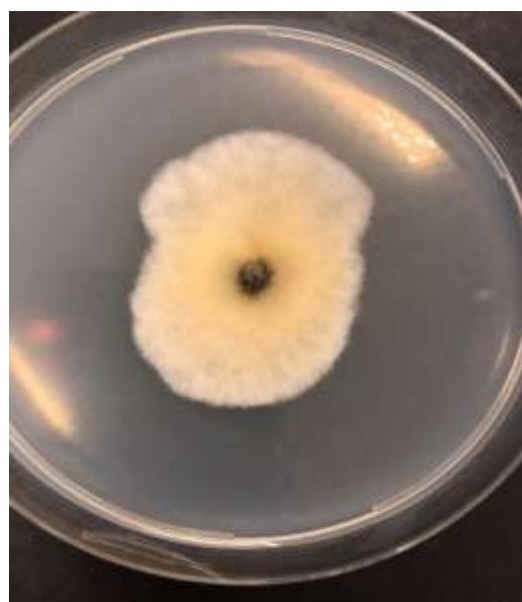
a



b



c



d

Imagem 27: Fungo endofítico A3 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b



c

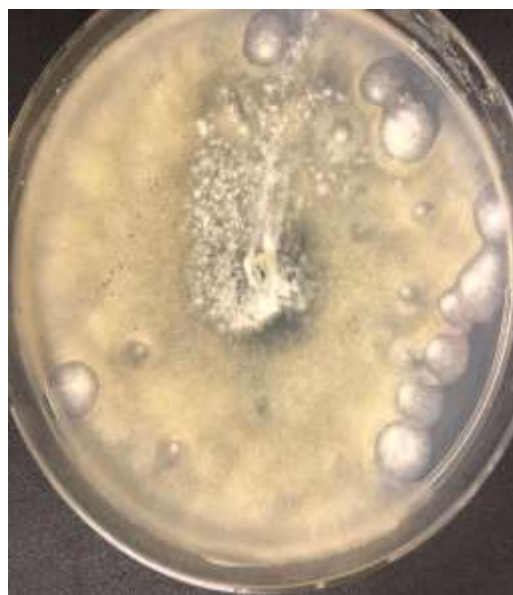


d

Imagem 28: Fungo endofítico A4 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

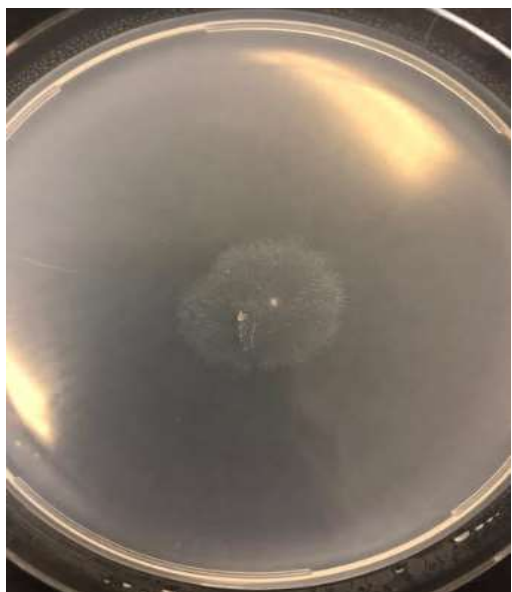


c



d

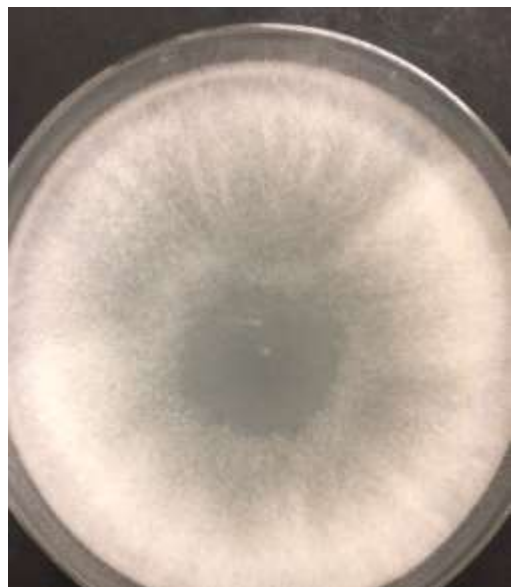
Imagem 29: Fungo endofítico A5 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



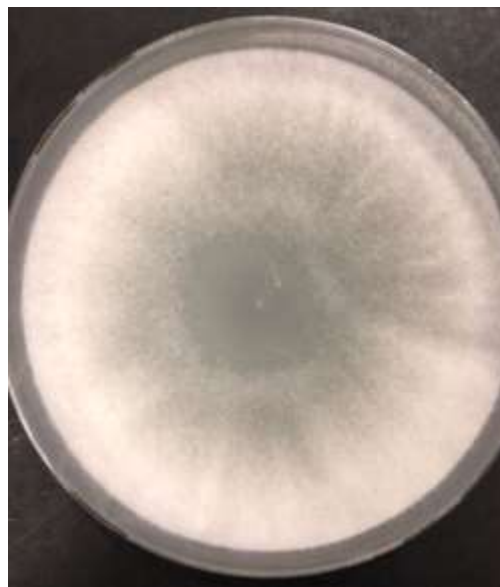
a



b

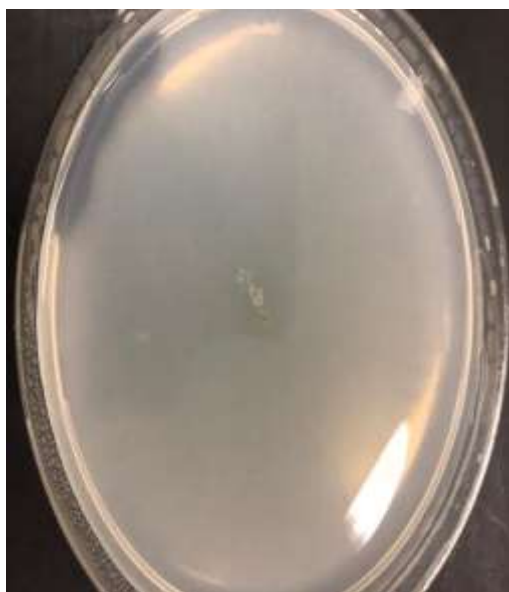


c

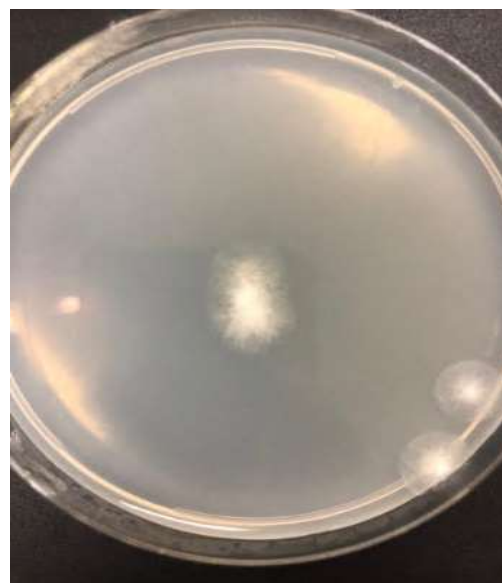


d

Imagem 30: Fungo endofítico A6 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

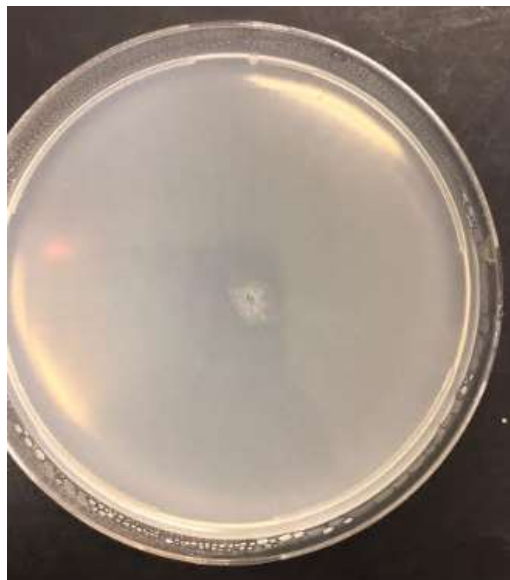


c



d

Imagem 31: Fungo endofítico A7 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



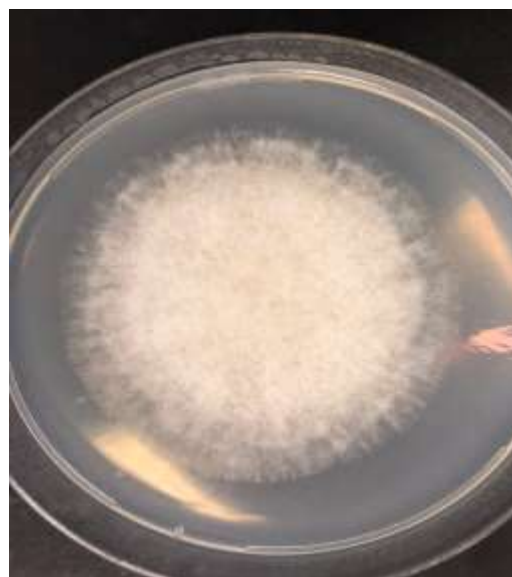
a



b

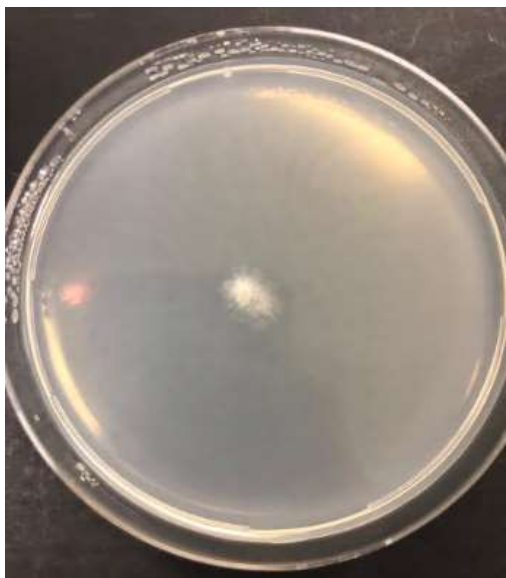


c



d

Imagem 32: Fungo endofítico A8 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

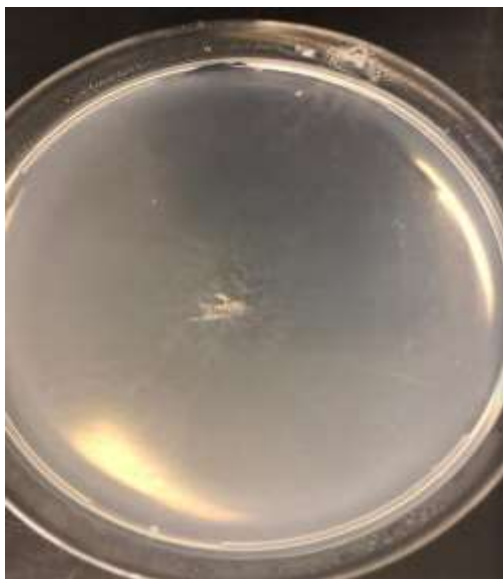


c



d

Imagem 33: Fungo endofítico B1 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

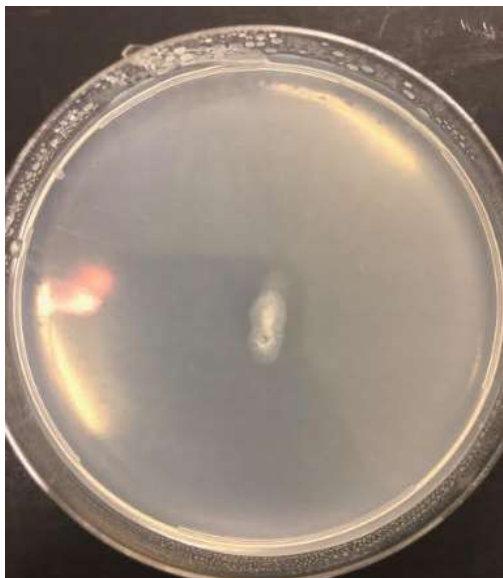


c

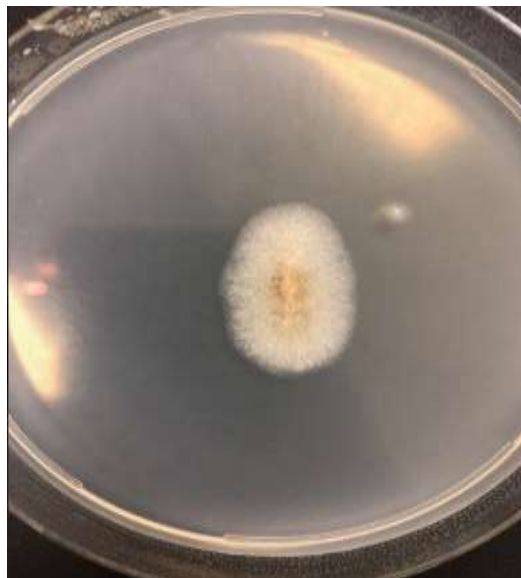


d

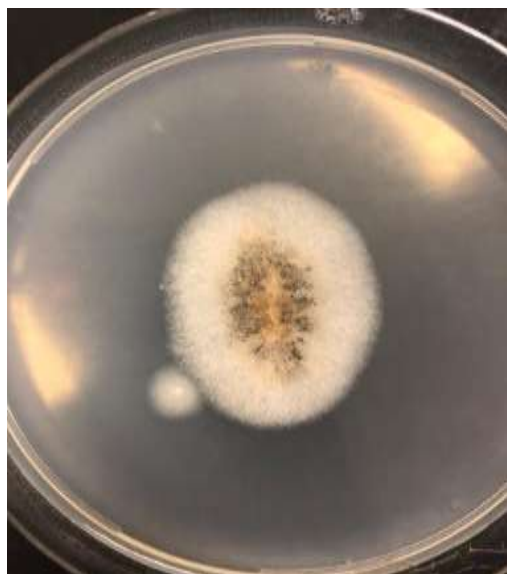
Imagem 34: Fungo endofítico B2 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



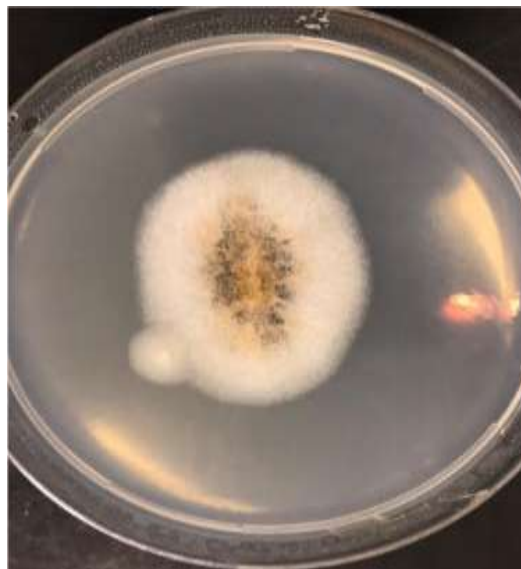
a



b



c



d

Imagem 35: Fungo endofítico B3 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

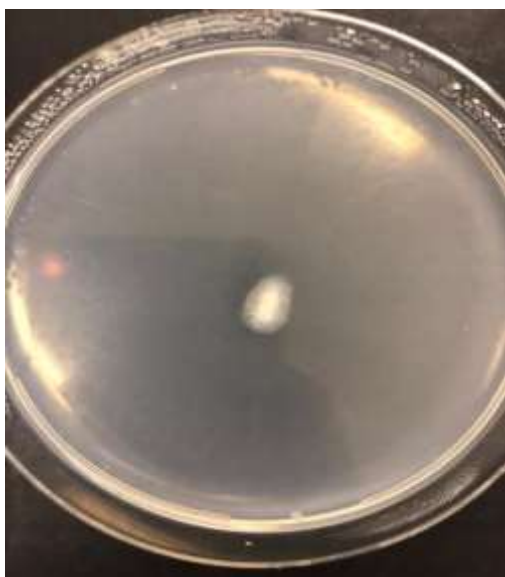


c



d

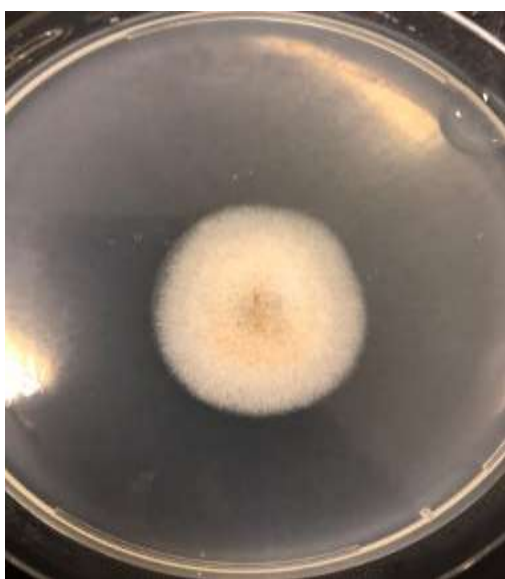
Imagem 36: Fungo endofítico B4 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



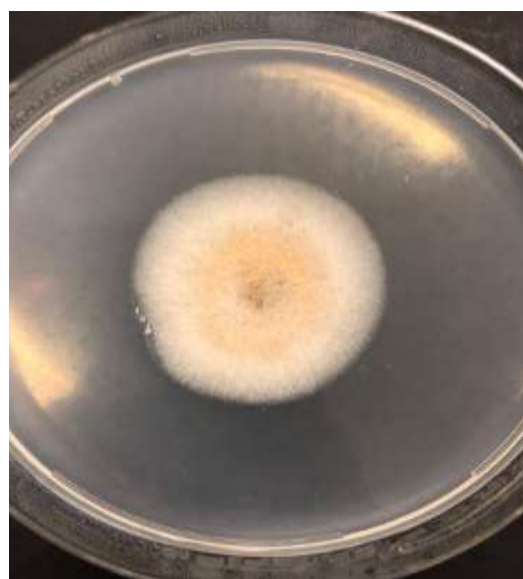
a



b

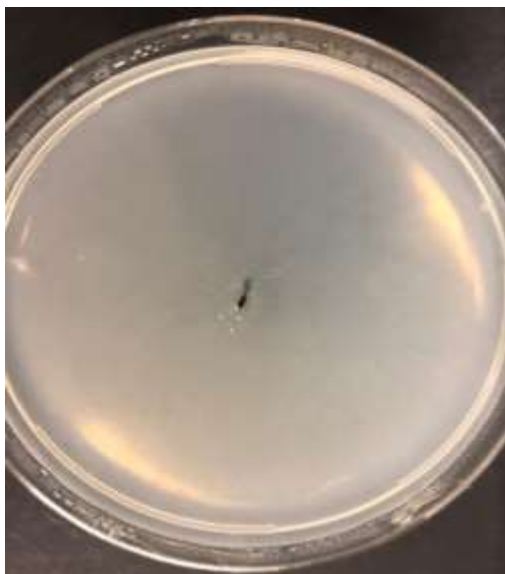


c



d

Imagem 37: Fungo endofítico B5 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b



c

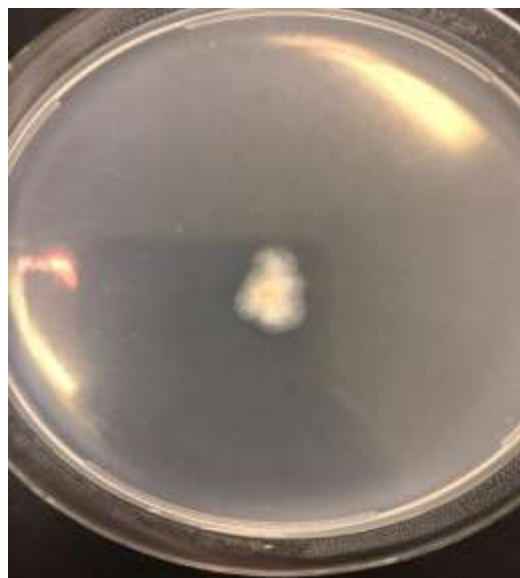


d

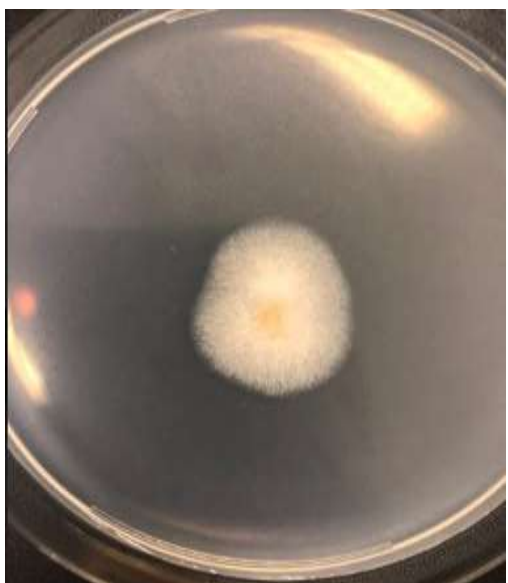
Imagem 38: Fungo endofítico B6 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b

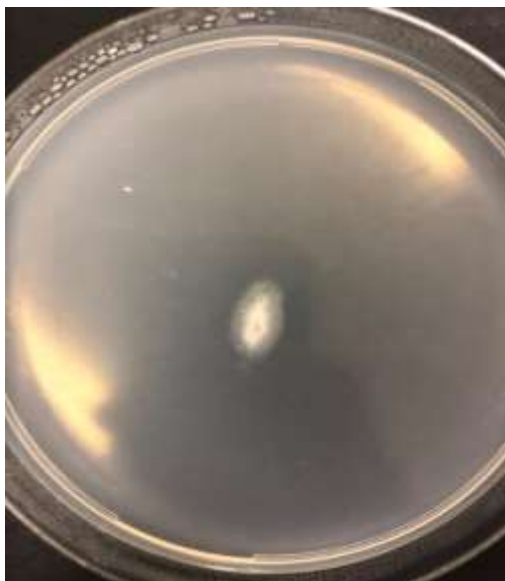


c



d

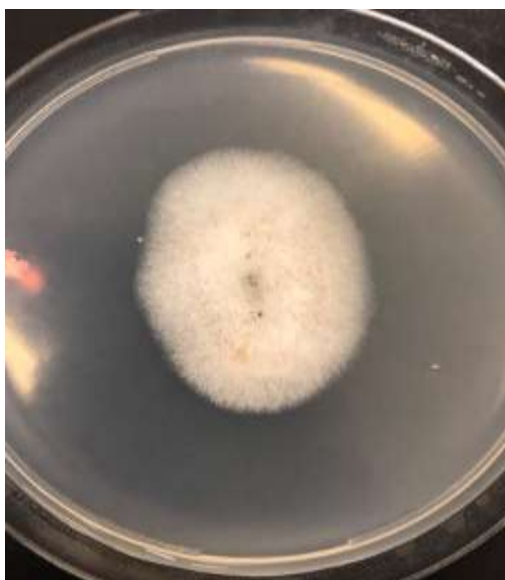
Imagem 39: Fungo endofítico B7 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



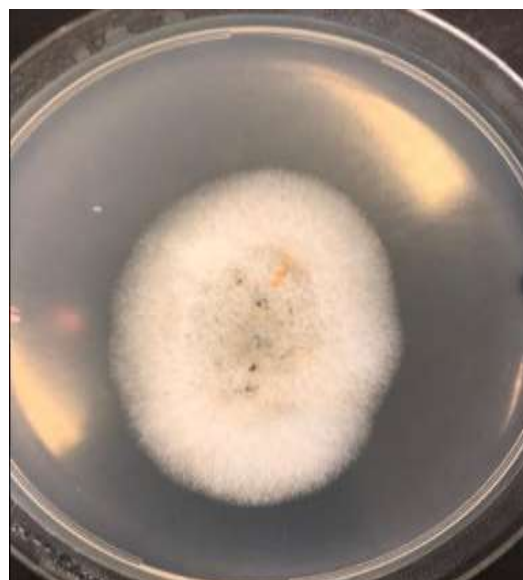
a



b

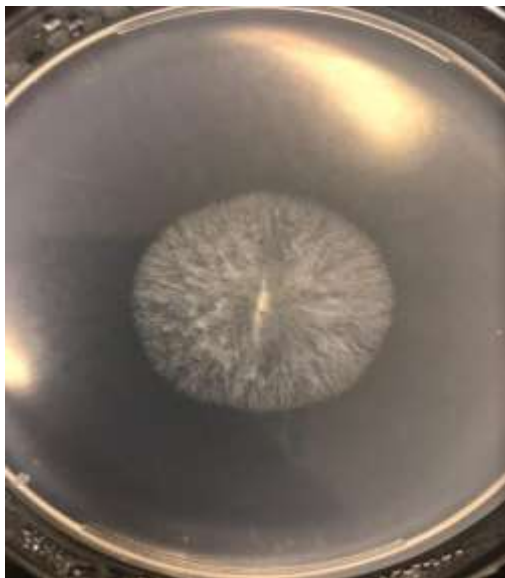


c

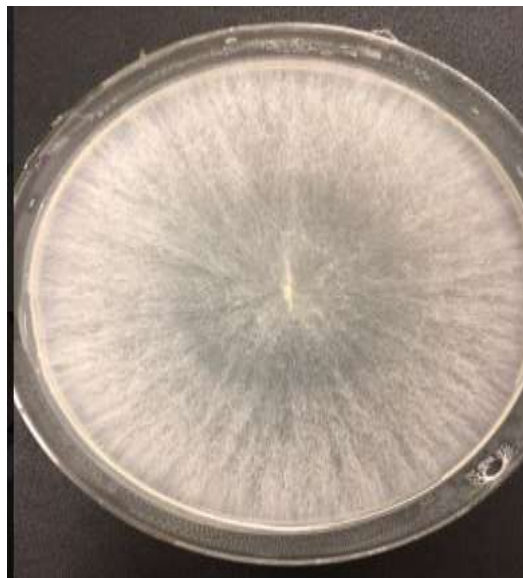


d

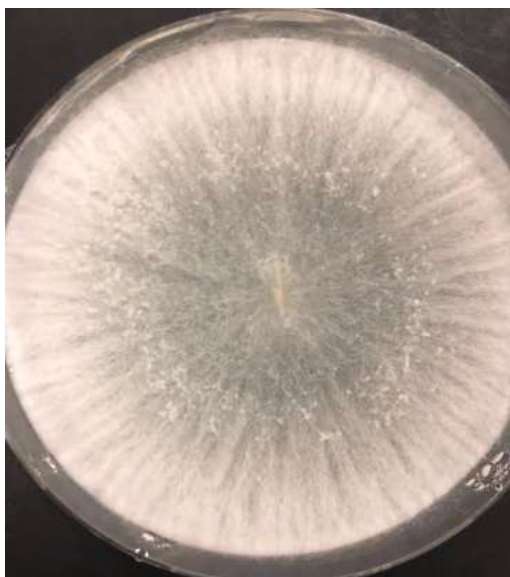
Imagem 40: Fungo endofítico B8 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



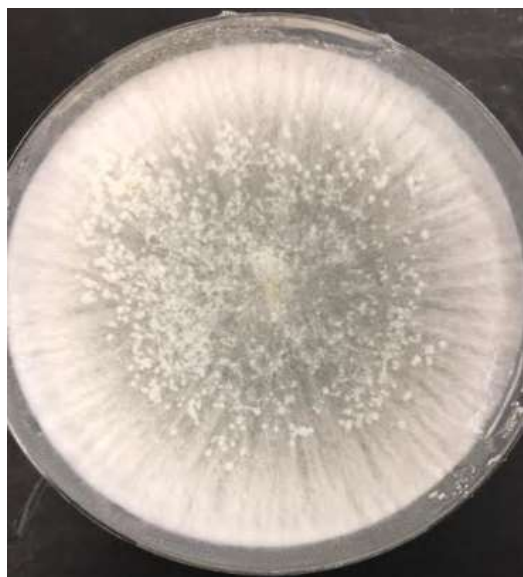
a



b



c



d

Imagem 41: Fungo endofítico B9 (a – 48 horas de incubação; b – 72 horas de incubação; c – 96 horas de incubação; d – 120 horas de incubação)



a



b



c



d

Anexo 2: Imagens da microscopia dos fungos endofíticos isolados



Imagem 42: A1 – *Aspergillus*

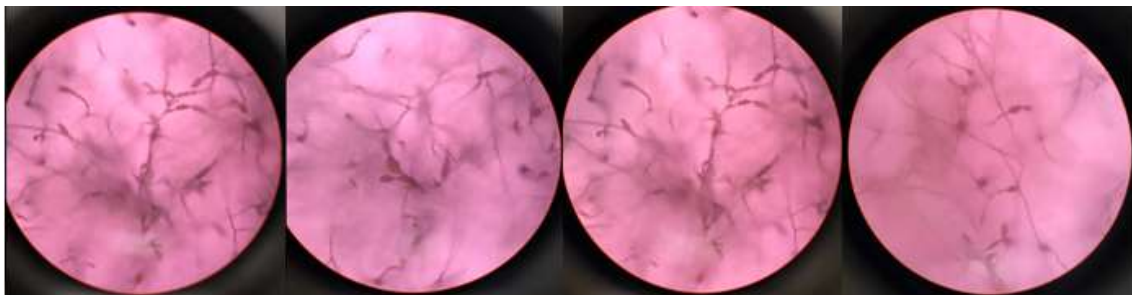


Imagem 43: A2 – *Alternaria*

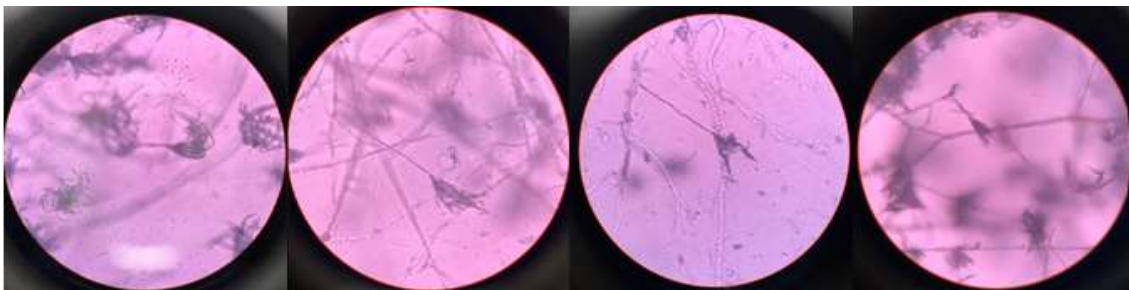


Imagem 44: A4 – *Penicillium*



Imagem 45: A6 – *Absidia*

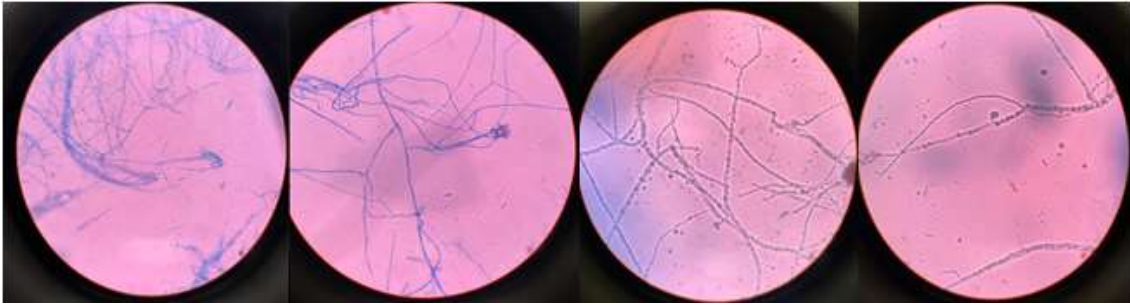


Imagem 46: B2 – *Acremonium*

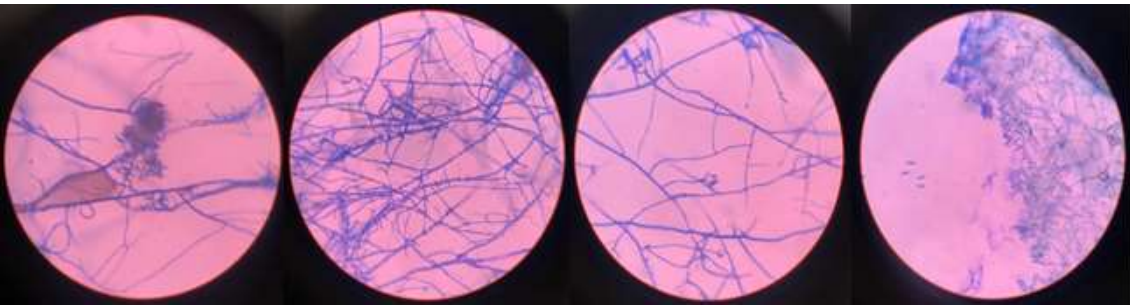


Imagem 47: B4 – *Acremonium*

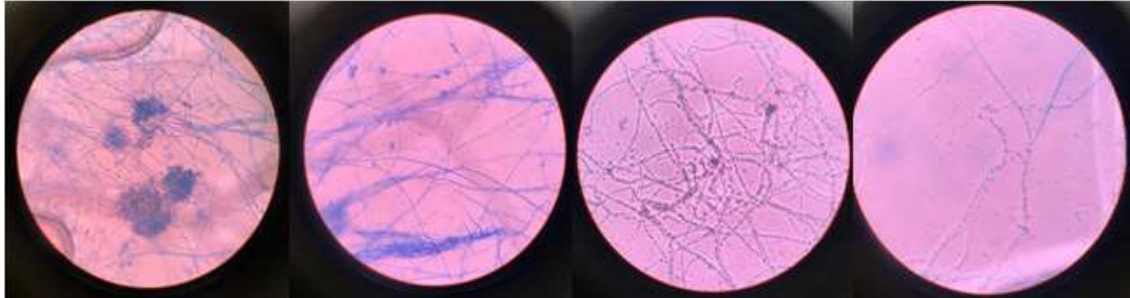


Imagem 48: B7 – *Acremonium*

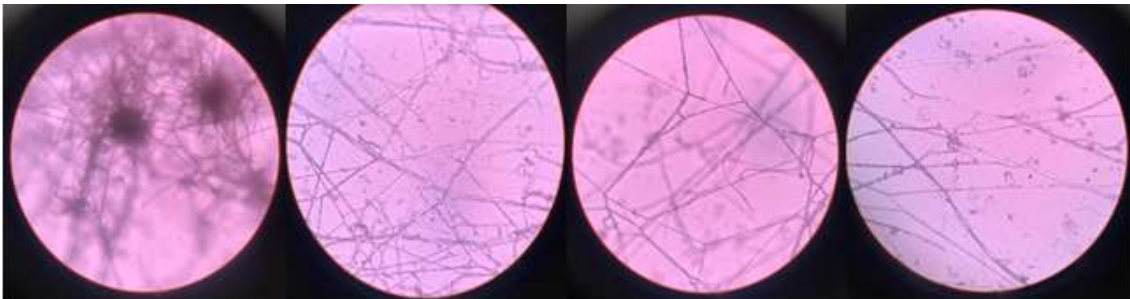


Imagem 49: B9 – *Chaetomium*

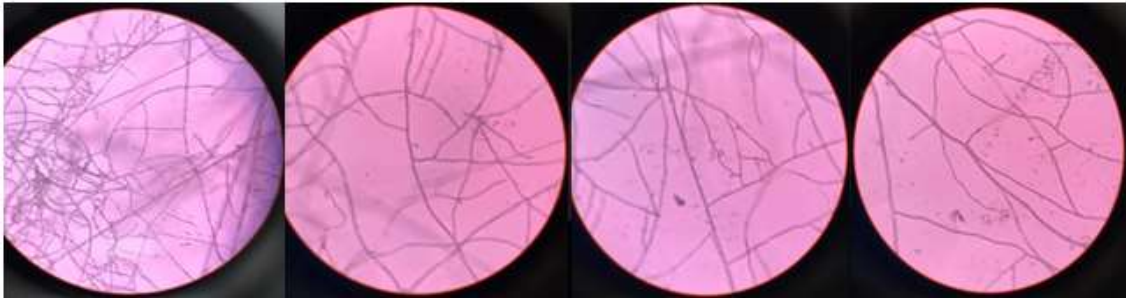


Imagem 50: A3 – Micélio estéril



Imagem 51: A5 – Micélio estéril



Imagem 52: A7 – Micélio estéril



Imagem 53: A8 – Micélio estéril



Imagem 54: B1 – Micélio estéril

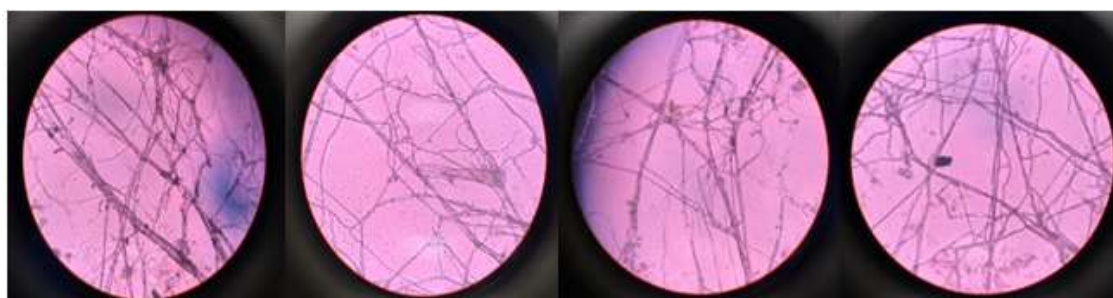


Imagem 55: B3 – Micélio estéril

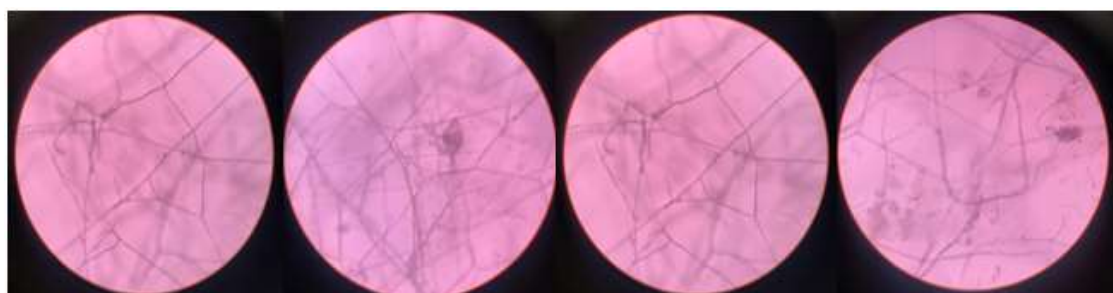


Imagem 56: B5 – Micélio estéril

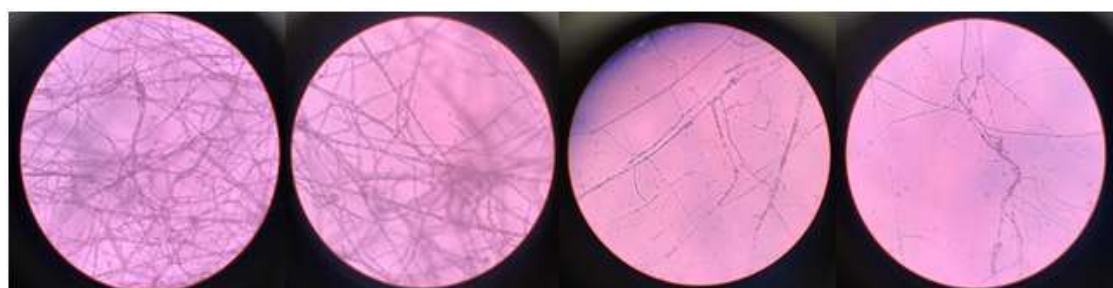


Imagem 57: B6 – Micélio estéril

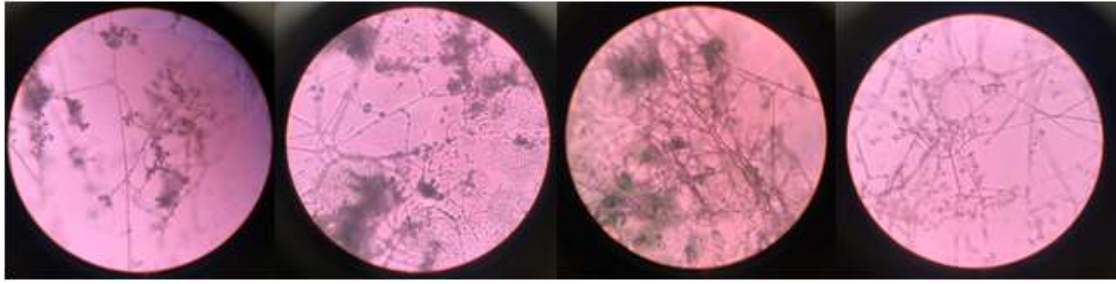


Imagem 58: B8 – Estrutura não identificada